(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2020-5635
(P2020-5635A)
(43)公開日　令和2年1月16日(2020.1.16)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	ZNA	4B063
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z	4B064
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4B065
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4C085
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4H045

審査請求 有　請求項の数 38　ＯＬ　（全 95 頁）　最終頁に続く

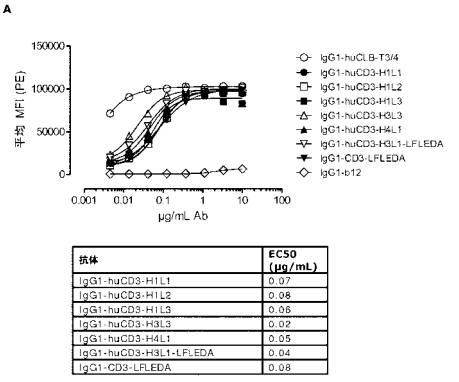
(21)出願番号　特願2019-114397 (P2019-114397)
(22)出願日　令和1年6月20日 (2019.6.20)
(62)分割の表示　特願2016-522644 (P2016-522644)の分割
原出願日　平成26年7月4日 (2014.7.4)
(31)優先権主張番号　PCT/EP2013/064330
(32)優先日　平成25年7月5日 (2013.7.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関　欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　PCT/EP2014/050340
(32)優先日　平成26年1月9日 (2014.1.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　507316398
ゲンマブ　エー／エス
デンマーク　ディーケイ－１５６０　コペンハーゲン　ブイ　カルヴェボー　ブリッゲ　４３
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一

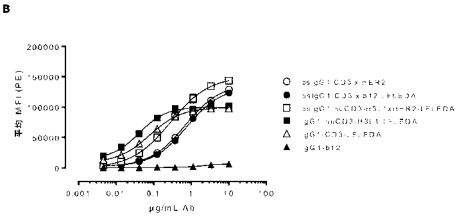
最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト化またはキメラＣＤ３抗体

(57)【要約】　（修正有）
【課題】CD3に結合するヒト化またはキメラ抗体、その使用用を提供する。
【解決手段】CD3に結合するヒト化またはキメラ抗体、二重特異性抗体。野生型抗体と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも99%、または100%低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように修飾されたFc領域を含む、抗体。該抗体を含む、組成物、薬学的組成物、疾患の処置における該抗体の使用、および処置の方法。
【選択図】図１



抗体	EC50 (µg/mL)
IgG1-huCD3-H1L1	0.07
IgG1-huCD3-H1L2	0.08
IgG1-huCD3-H1L3	0.06
IgG1-huCD3-H3L3	0.02
IgG1-huCD3-H4L1	0.05
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.08



抗体	EC50 (µg/mL)
bsIgG1 CD3 x HER2	0.68
bsIgG1 CD3 x b12-LFLEDA	0.75
bsIgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.28
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.07

【特許請求の範囲】
【請求項１】
それぞれSEQ ID NO：1、2、および3に示す配列を有する重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3と、それぞれSEQ ID NO：4に示す配列、配列GTN、およびSEQ ID NO：5に示す配列を有する軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、およびCDR3とを含む結合領域を含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体。
【請求項２】
VH領域が、
（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列、
（c）SEQ ID NO：7に示すVH配列、および
（d）SEQ ID NO：9に示すVH配列
からなる群より選択されるVH配列に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1記載の抗体。
【請求項３】
VL領域が、
（a）SEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：11に示すVL配列、および
（c）SEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択されるVL配列に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％のアミノ酸配列同一性を有する、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項４】
VH領域が、
（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列、
（c）SEQ ID NO：7に示すVH配列、および
（d）SEQ ID NO：9に示すVH配列
からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項５】
VL領域が、
（a）SEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：11に示すVL配列、および
（c）SEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項６】
VH領域およびVL領域が、
（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（c）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（d）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、
（e）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列、
（f）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（g）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、
（h）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列、
（i）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、
（j）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列、
（k）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、ならびに
（l）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列

からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項７】
結合領域が、
（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、ならびに
（c）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列
からなる群より選択されるVH配列およびVL配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項８】
ヒト化抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項９】
キメラ抗体である、請求項1記載の抗体。
【請求項１０】
全長抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項１１】
第1および第2免疫グロブリン重鎖を含むFc領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項１２】
第1および第2重鎖が、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプのものである、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項１３】
抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％低減するように修飾されたFc領域を含み、
C1q結合がELISAによって決定される、
前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項１４】
野生型抗体と比較して前記抗体が少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように修飾されたFc領域を含み、
該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される、
前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項１５】
野生型抗体と比較した場合に、前記抗体がFc媒介CD69発現を少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減するように修飾されたFc領域を含み、
Fc媒介CD69発現がPBMCに基づく機能アッセイにおいて決定される、
前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項１６】
第1および第2免疫グロブリン重鎖を含み、
該第1および該第2免疫グロブリン重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置にある1つまたは複数のアミノ酸が、それぞれL、L、D、N、およびPではない、
前記請求項のいずれか一項記載の抗体。
【請求項１７】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸がDではない、請求項16記載の抗体。
【請求項１８】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置N297に対応する位置のアミノ酸がNではない、請求項16記載の抗体。

【請求項１９】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれLおよびLではない、請求項16記載の抗体。
【請求項２０】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれFおよびEであるか、またはAおよびAである、請求項16および19のいずれか一項記載の抗体。
【請求項２１】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれFおよびEである、請求項20記載の抗体。
【請求項２２】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、少なくともヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれAおよびAである、請求項20記載の抗体。
【請求項２３】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれL、L、およびDではない、請求項1～16のいずれか一項記載の抗体。
【請求項２４】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれF、E、およびAであるか、またはA、A、およびAである、請求項23記載の抗体。
【請求項２５】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれF、E、およびAである、請求項24記載の抗体。
【請求項２６】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれA、A、およびAである、請求項24記載の抗体。
【請求項２７】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、Q、およびSである、請求項16記載の抗体。
【請求項２８】
請求項1～12のいずれか一項に記載の抗体の第1結合領域と、該第1抗原結合領域とは異なるターゲットに結合する第2結合領域とを含む、二重特異性抗体。
【請求項２９】
第1および第2重鎖を含む、請求項28記載の二重特異性抗体。
【請求項３０】
（a）二重特異性抗体が、請求項13～15のいずれか一項に従って修飾されたFc領域を含むか、または
（b）第1および第2重鎖の少なくとも一方が、請求項16～27のいずれか一項に記載するように修飾された1つまたは複数のアミノ酸を含む、
請求項29記載の二重特異性抗体。
【請求項３１】
第1および第2重鎖のそれぞれが、少なくともヒンジ領域、CH2およびCH3領域を含み、該第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも1つが置換されており、該第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも1つが置

換されており、該第1および該第2重鎖が同じ位置では置換されていない、請求項28～30のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項３２】
ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸が第1重鎖ではLであり、かつヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸が第2重鎖ではRであるか、またはその逆である、請求項31記載の二重特異性抗体。
【請求項３３】
第1結合領域が請求項1～7のいずれか一項に従い、第2結合領域が該第1結合領域とは異なるターゲットに結合する、請求項28～32のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項３４】
表1に示す1つまたは複数のアミノ酸配列をコードする、核酸コンストラクト。
【請求項３５】
（i）請求項1～33のいずれか一項記載のヒト化抗体もしくはキメラ抗体の重鎖配列をコードする核酸配列、
（ii）請求項1～33のいずれか一項記載のヒト化抗体もしくはキメラ抗体の軽鎖配列をコードする核酸配列、または
（iii）（i）と（ii）の両方
を含む発現ベクター。
【請求項３６】
請求項35記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。
【請求項３７】
組換え真核宿主細胞、組換え原核宿主細胞、または組換え微生物宿主細胞である、請求項36記載の宿主細胞。
【請求項３８】
請求項1～27のいずれか一項記載の抗体または請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体を含む、組成物。
【請求項３９】
請求項1～27のいずれか一項記載の抗体または請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。
【請求項４０】
医薬として使用するための、請求項1～27のいずれか一項記載の抗体、請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体、請求項38記載の組成物、または請求項39記載の薬学的組成物。
【請求項４１】
疾患の処置に使用するための、請求項1～27のいずれか一項記載の抗体、請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体、請求項38記載の組成物、または請求項39記載の薬学的組成物。
【請求項４２】
請求項1～27のいずれか一項記載の抗体、請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体、請求項38記載の組成物、または請求項39記載の薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、疾患の処置方法。
【請求項４３】
疾患が、がん、感染性疾患、または自己免疫疾患である、請求項40～42のいずれか一項記載の使用または方法。
【請求項４４】
請求項1～27のいずれか一項記載の抗体、請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体、請求項38記載の組成物、または請求項39記載の薬学的組成物を対象に投与する工程を含み、任意で該抗体または該二重特異性抗体が検出可能な作用物質で標識される、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患を診断する方法。
【請求項４５】

（a）請求項36～37のいずれか一項記載の宿主細胞を培養する工程、および
（b）培養培地から抗体を精製する工程
を含む、請求項1～27のいずれか一項記載の抗体または請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体を生産するための方法。
【請求項４６】
請求項1～27のいずれか一項記載の抗体または請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体を含む、診断用組成物。
【請求項４７】
（a）試料を、請求項1～27のいずれか一項記載の抗体または請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体と、該抗体または二重特異性抗体とCD3との複合体の形成が可能な条件下で接触させる工程、および
（b）複合体が形成されたかどうかを解析する工程
を含む、試料中のCD3抗原の存在またはCD3を発現する細胞の存在を検出するための方法。
【請求項４８】
（i）請求項1～27のいずれか一項記載の抗体または請求項28～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体、および
（ii）キットの使用説明書
を含む、試料中のCD3抗原の存在またはCD3を発現する細胞の存在を検出するためのキット。
【請求項４９】
請求項1～27のいずれか一項記載の抗体に結合する抗イディオタイプ抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体、該ヒト化またはキメラ抗体を含む組成物、および疾患の処置における該ヒト化またはキメラ抗体の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
背景
分化抗原群（Cluster of Differentiation）3（CD3）は古くから知られており、それゆえに多くの局面において関心の対象となってきた。具体的には、CD3に対して生じた抗体またはCD3を一成分とするT細胞受容体複合体に対して生じた抗体が知られている。5つのヒト化OKT3エフェクター機能変異体抗体のインビトロキャラクタリゼーションが記載されている［1］。
【０００３】
抗CD3モノクローナル抗体hOKT3ガンマ1（Ala-Ala）による処置は、継続的な免疫抑制薬の投与がない状態で、1型糖尿病の発症後に少なくとも2年間は、Cペプチド応答および臨床パラメータの改良をもたらす［2］。
【０００４】
標的抗体療法を改良するための有望なアプローチは、抗原を発現するがん細胞に、細胞傷害性細胞を送達することによる方法である。腫瘍細胞を効率よく殺すためにT細胞を使用するというこのコンセプトは既に記述されている［3］。しかし初期の臨床研究はむしろ期待外れで、その理由は主として、低い効力、重篤な有害作用（サイトカインストーム）および二重特異性抗体の免疫原性にあった［4］。二重特異性抗体の設計と応用が進歩したことにより、サイトカインストームという最初の障壁は部分的に克服され、臨床有効性が改良されて用量制限毒性はなくなっている［5］。
【０００５】
例えば、一方のアームで腫瘍細胞上の抗原を標的とし他方のアームで例えばT細胞上のCD3を標的とする一定の二重特異性抗体は、Fc領域によるFc受容体結合を与える。結合する

と、T細胞と、腫瘍細胞と、抗体Fc領域に結合するエフェクター細胞との複合体が形成されて、それが腫瘍細胞の殺滅につながる［4］。カツマキソマブはマウスIgG2a/ratIgG2bヘテロ二量体からなり、腹腔内適用によるがん関連腹水の処置に成功を収めている［6］。しかし、マウス/ラットハイブリッドは免疫原性であり［7］、ヒトにおける長期静脈内処置には応用することができない。カツマキソマブに起因する高頻度の処置関連有害イベントには、カツマキソマブのFc領域のエフェクター機能に関係するサイトカイン放出関連症状（すなわち発熱、悪心、嘔吐、悪寒、頻脈および低血圧）［8］～［9］が含まれていた。別の抗体が、HER2発現量が低い細胞株において細胞傷害を誘発するエルツマキソマブ（HER2×CD3）である。エルツマキソマブは転移乳がんに関して第II相臨床開発中である［10］～［11］。

【０００６】

カニクイザルおよび/またはアカゲザルCD3に交差反応するCD3抗体は記述されているが［12］～［13］、そのような交差反応性抗体にはさらなる改良が必要である。

【発明の概要】

【０００７】

ヒト化またはキメラCD3抗体を提供することが本発明の目的である。したがって一局面において本発明は、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体であって、それぞれSEQ ID NO：1、2、および3に示す配列を有する重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3と、それぞれSEQ ID NO：4に示す配列、配列GTN、およびSEQ ID NO：5に示す配列を含む軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、およびCDR3とを含む結合領域を含む抗体に関する。

【０００８】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体の第1結合領域と、該第1抗原結合領域とは異なるターゲットに結合する第2結合領域とを含む、二重特異性抗体に関する。

【０００９】

別の局面において、本発明は、本発明の1つまたは複数のアミノ酸配列をコードする核酸コンストラクトに関する。

【００１０】

別の局面において、本発明は、（i）本発明のヒト化またはキメラ抗体の重鎖配列をコードする核酸配列、（ii）本発明のヒト化またはキメラ抗体の軽鎖配列をコードする核酸配列、または（iii）（i）と（ii）の両方を含む発現ベクターに関する。

【００１１】

別の局面において、本発明は、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞に関する。

【００１２】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体または二重特異性抗体を含む組成物に関する。

【００１３】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体または二重特異性抗体と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物に関する。

【００１４】

別の局面において、本発明は、医薬として使用するための、本発明の抗体もしくは二重特異的抗体、組成物、または薬学的組成物に関する。

【００１５】

別の局面において、本発明は、疾患の処置に使用するための、本発明の抗体もしくは二重特異的抗体、組成物、または薬学的組成物に関する。

【００１６】

別の局面において、本発明は、疾患の処置を必要とする対象に本発明の抗体もしくは二重特異的抗体、組成物、または薬学的組成物を投与する工程を含む、疾患の処置方法に関する。

【００１７】

一局面において、本発明は、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患を診断す

る方法であって、検出可能な作用物質で標識されていてもよい本発明のヒト化またはキメラ抗体、本発明の組成物、または本発明の薬学的組成物を対象に投与する工程を含む方法に関する。

【００１８】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体または二重特異性抗体を生産するための方法であって、a）本発明の宿主細胞を培養する工程、およびb）培養培地から前記抗体を精製する工程を含む方法に関する。

【００１９】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体または二重特異性抗体を含む診断用組成物に関する。

【００２０】

別の局面において、本発明は、試料中のCD3抗原の存在またはCD3を発現する細胞の存在を検出するための方法であって、a）前記試料を本発明の抗体または二重特異性抗体と、前記抗体または二重特異性抗体とCD3との複合体の形成が可能な条件下で接触させる工程、およびb）複合体が形成されたかどうかを解析する工程を含む方法に関する。

【００２１】

別の局面において、本発明は、i）本発明の抗体または二重特異性抗体と、ii）キットの使用説明書とを含む、試料中のCD3抗原の存在またはCD3を発現する細胞の存在を検出するためのキットに関する。

【００２２】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体に結合する抗イディオタイプ抗体に関する。

[本発明1001]

それぞれSEQ ID NO：1、2、および3に示す配列を有する重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3と、それぞれSEQ ID NO：4に示す配列、配列GTN、およびSEQ ID NO：5に示す配列を有する軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、およびCDR3とを含む結合領域を含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体。

[本発明1002]

VH領域が、

（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列、
（c）SEQ ID NO：7に示すVH配列、および
（d）SEQ ID NO：9に示すVH配列

からなる群より選択されるVH配列に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％のアミノ酸配列同一性を有する、本発明1001の抗体。

[本発明1003]

VL領域が、

（a）SEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：11に示すVL配列、および
（c）SEQ ID NO：12に示すVL配列

からなる群より選択されるVL配列に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％のアミノ酸配列同一性を有する、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1004]

VH領域が、

（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列、
（c）SEQ ID NO：7に示すVH配列、および
（d）SEQ ID NO：9に示すVH配列

からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1005]
VL領域が、
（a）SEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：11に示すVL配列、および
（c）SEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1006]
VH領域およびVL領域が、
（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（c）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（d）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、
（e）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列、
（f）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（g）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、
（h）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列、
（i）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、
（j）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列、
（k）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、ならびに
（l）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択される、前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1007]
結合領域が、
（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、ならびに
（c）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列
からなる群より選択されるVH配列およびVL配列を含む、前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1008]
ヒト化抗体である、前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1009]
キメラ抗体である、本発明1001の抗体。
[本発明1010]
全長抗体である、前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1011]
第1および第2免疫グロブリン重鎖を含むFc領域を含む、前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1012]
第1および第2重鎖が、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプのものである、前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1013]
抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％低減するように修飾されたFc領域を含み、
C1q結合がELISAによって決定される、
前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1014]
野生型抗体と比較して前記抗体が少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように修飾されたFc領域を含み、
該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される、

前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1015]
野生型抗体と比較した場合に、前記抗体がFc媒介CD69発現を少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減するように修飾されたFc領域を含み、
Fc媒介CD69発現がPBMCに基づく機能アッセイにおいて決定される、
前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1016]
第1および第2免疫グロブリン重鎖を含み、
該第1および該第2免疫グロブリン重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置にある1つまたは複数のアミノ酸が、それぞれL、L、D、N、およびPではない、
前記本発明のいずれかの抗体。
[本発明1017]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸がDではない、本発明1016の抗体。
[本発明1018]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置N297に対応する位置のアミノ酸がNではない、本発明1016の抗体。
[本発明1019]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれLおよびLではない、本発明1016の抗体。
[本発明1020]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれFおよびEであるか、またはAおよびAである、本発明1016および1019のいずれかの抗体。
[本発明1021]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれFおよびEである、本発明1020の抗体。
[本発明1022]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、少なくともヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれAおよびAである、本発明1020の抗体。
[本発明1023]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれL、L、およびDではない、本発明1001～1016のいずれかの抗体。
[本発明1024]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれF、E、およびAであるか、またはA、A、およびAである、本発明1023の抗体。
[本発明1025]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれF、E、およびAである、本発明1024の抗体。
[本発明1026]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれA、A、およびAである、本発明1024の抗体。
[本発明1027]
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、Q、およびSである、本発明1016の抗体。

[本発明1028]
本発明1001～1012のいずれかの抗体の第1結合領域と、該第1抗原結合領域とは異なるターゲットに結合する第2結合領域とを含む、二重特異性抗体。
[本発明1029]
第1および第2重鎖を含む、本発明1028の二重特異性抗体。
[本発明1030]
（a）二重特異性抗体が、本発明1013～1015のいずれかに従って修飾されたFc領域を含むか、または
（b）第1および第2重鎖の少なくとも一方が、本発明1016～1027のいずれかのように修飾された1つまたは複数のアミノ酸を含む、
本発明1029の二重特異性抗体。
[本発明1031]
第1および第2重鎖のそれぞれが、少なくともヒンジ領域、CH2およびCH3領域を含み、該第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも1つが置換されており、該第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも1つが置換されており、該第1および該第2重鎖が同じ位置では置換されていない、本発明1028～1030のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1032]
ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸が第1重鎖ではLであり、かつヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸が第2重鎖ではRであるか、またはその逆である、本発明1031の二重特異性抗体。
[本発明1033]
第1結合領域が本発明1001～1007のいずれかに従い、第2結合領域が該第1結合領域とは異なるターゲットに結合する、本発明1028～1032のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1034]
表1に示す1つまたは複数のアミノ酸配列をコードする、核酸コンストラクト。
[本発明1035]
（i）本発明1001～1033のいずれかのヒト化抗体もしくはキメラ抗体の重鎖配列をコードする核酸配列、
（ii）本発明1001～1033のいずれかのヒト化抗体もしくはキメラ抗体の軽鎖配列をコードする核酸配列、または
（iii）（i）と（ii）の両方
を含む発現ベクター。
[本発明1036]
本発明1035の発現ベクターを含む、宿主細胞。
[本発明1037]
組換え真核宿主細胞、組換え原核宿主細胞、または組換え微生物宿主細胞である、本発明1036の宿主細胞。
[本発明1038]
本発明1001～1027のいずれかの抗体または本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体を含む、組成物。
[本発明1039]
本発明1001～1027のいずれかの抗体または本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。
[本発明1040]
医薬として使用するための、本発明1001～1027のいずれかの抗体、本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体、本発明1038の組成物、または本発明1039の薬学的組成物。
[本発明1041]

疾患の処置に使用するための、本発明1001～1027のいずれかの抗体、本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体、本発明1038の組成物、または本発明1039の薬学的組成物。

[本発明1042]

本発明1001～1027のいずれかの抗体、本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体、本発明1038の組成物、または本発明1039の薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、疾患の処置方法。

[本発明1043]

疾患が、がん、感染性疾患、または自己免疫疾患である、本発明1040～1042のいずれかの使用または方法。

[本発明1044]

本発明1001～1027のいずれかの抗体、本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体、本発明1038の組成物、または本発明1039の薬学的組成物を対象に投与する工程を含み、任意で該抗体または該二重特異性抗体が検出可能な作用物質で標識される、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患を診断する方法。

[本発明1045]

（a）本発明1036～1037のいずれかの宿主細胞を培養する工程、および

（b）培養培地から抗体を精製する工程

を含む、本発明1001～1027のいずれかの抗体または本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体を生産するための方法。

[本発明1046]

本発明1001～1027のいずれかの抗体または本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体を含む、診断用組成物。

[本発明1047]

（a）試料を、本発明1001～1027のいずれかの抗体または本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体と、該抗体または二重特異性抗体とCD3との複合体の形成が可能な条件下で接触させる工程、および

（b）複合体が形成されたかどうかを解析する工程

を含む、試料中のCD3抗原の存在またはCD3を発現する細胞の存在を検出するための方法。

[本発明1048]

（i）本発明1001～1027のいずれかの抗体または本発明1028～1033のいずれかの二重特異性抗体、および

（ii）キットの使用説明書

を含む、試料中のCD3抗原の存在またはCD3を発現する細胞の存在を検出するためのキット。

[本発明1049]

本発明1001～1027のいずれかの抗体に結合する抗イディオタイプ抗体。

【図面の簡単な説明】

【００２３】

【図１】ヒトT細胞株Jurkatに対する（図1A）IgG1-huCD3の単一特異性抗体変異体および（図1B）二重特異性抗体変異体bsIgG1 huCD3×HER2の結合曲線を表す。表示のデータは、実施例2で述べるように、代表的な一実験の平均蛍光強度（MFI）である。表は、50％最大結合（half-maximal binding）（EC50）をもたらす抗体濃度（μg/mL）を表す。

【図２】カニクイザルT細胞株HSC-Fに対する（図2A）IgG1-huCD3の単一特異性抗体変異体および（図2B）二重特異性抗体変異体bsIgG1 huCD3×HER2の結合曲線を表す。表示のデータは、実施例2で述べるように、代表的な一実験の平均蛍光強度（MFI）である。

【図３】IgG1-huCD3抗体変異体によるT細胞活性化。PBMC培養におけるヒト（図3A）およびカニクイザル（図3B）由来のT細胞上でのCD69の発現を、実施例3で述べるようにFACS解析によって測定した。これらの実験は2回行った。1回の実験からの代表的結果を示す。

【図４】IgG1-huCD3抗体変異体が誘発するT細胞増殖。ヒト（図4A）またはカニクイザル（図4B）PBMCを、IgG1-huCD3抗体変異体と共に3日間インキュベートした後、実施例4で述

べるように細胞増殖ELISAによって、増殖を測定した。2回の独立した実験から代表的な結果を示す。
【図５】非活性化LFLEDA変異を持つhuCD3抗体変異体によるヒト（図5A）およびカニクイザル（図5B）T細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例5で説明するように決定した。二つ一組にして行った2回の独立した実験からの代表的結果を示す。
【図６Ａ】ヒトT細胞株Jurkatに対するIgG1-huCD3の非活性化単一特異性抗体変異体の結合曲線を表す。表示のデータは、実施例2で述べるように、代表的な一実験の平均蛍光強度（MFI）である。表は、50％最大結合（EC50）をもたらす抗体濃度（μg/mL）を表す。
【図６Ｂ】ヒトT細胞株Jurkatに対するIgG1-huCD3の非活性化二重特異性抗体変異体bsIgG1-huCD3×HER2の結合曲線を表す。表示のデータは、実施例2で述べるように、代表的な一実験の平均蛍光強度（MFI）である。表は、50％最大結合（EC50）をもたらす抗体濃度（μg/mL）を表す。
【図７Ａ】カニクイザルT細胞株HSC-Fに対するIgG1-huCD3の非活性化単一特異性抗体変異体の結合曲線を示す。表示のデータは、実施例2で述べるように、代表的な一実験の平均蛍光強度（MFI）である。表は、50％最大結合（EC50）をもたらす抗体濃度（μg/mL）を表す。
【図７Ｂ】カニクイザルT細胞株HSC-Fに対するIgG1-huCD3の非活性化二重特異性抗体変異体bsIgG1-huCD3×HER2の結合曲線を示す。表示のデータは、実施例2で述べるように、代表的な一実験の平均蛍光強度（MFI）である。表は、50％最大結合（EC50）をもたらす抗体濃度（μg/mL）を表す。
【図８Ａ】非活性化単一特異性IgG1-huCD3によるT細胞活性化。PBMC培養におけるヒト由来のT細胞上でのCD69の発現を、実施例3で述べるように、FACS解析によって測定した。これらの実験は2回行った。1回の実験からの代表的結果を示す。
【図８Ｂ】非活性化単一特異性IgG1-huCD3によるT細胞活性化。PBMC培養におけるカニクイザル由来のT細胞上でのCD69の発現を、実施例3で述べるように、FACS解析によって測定した。これらの実験は2回行った。1回の実験からの代表的結果を示す。
【図８Ｃ】非活性化二重特異性bsIgG1-huCD3×HER2抗体変異体によるT細胞活性化。PBMC培養におけるヒト由来のT細胞上でのCD69の発現を、実施例3で述べるように、FACS解析によって測定した。これらの実験は2回行った。1回の実験からの代表的結果を示す。
【図８Ｄ】非活性化二重特異性bsIgG1-huCD3×HER2抗体変異体によるT細胞活性化。PBMC培養におけるカニクイザル由来のT細胞上でのCD69の発現を、実施例3で述べるように、FACS解析によって測定した。これらの実験は2回行った。1回の実験からの代表的結果を示す。
【図９Ａ】非活性化単一特異性IgG1-huCD3によって誘発されるT細胞増殖。T細胞増殖をヒトPBMCで測定した。これらのPBMCをさまざまな抗体変異体と共に3日間インキュベートした後、実施例4で述べるように細胞増殖ELISAによって増殖を測定した。2回の独立した実験からの代表的結果を示す。
【図９Ｂ】非活性化単一特異性IgG1-huCD3によって誘発されるT細胞増殖。T細胞増殖をカニクイザルPBMCで測定した。これらのPBMCをさまざまな抗体変異体と共に3日間インキュベートした後、実施例4で述べるように細胞増殖ELISAによって増殖を測定した。2回の独立した実験からの代表的結果を示す。
【図９Ｃ】非活性化二重特異性bsIgG1-huCD3×HER2抗体変異体によって誘発されるT細胞増殖。T細胞増殖をヒトPBMCで測定した。これらのPBMCをさまざまな抗体変異体と共に3日間インキュベートした後、実施例4で述べるように細胞増殖ELISAによって増殖を測定した。2回の独立した実験からの代表的結果を示す。
【図９Ｄ】非活性化二重特異性bsIgG1-huCD3×HER2抗体変異体によって誘発されるT細胞増殖。T細胞増殖をカニクイザルPBMCで測定した。これらのPBMCをさまざまな抗体変異体と共に3日間インキュベートした後、実施例4で述べるように細胞増殖ELISAによって増殖を測定した。2回の独立した実験からの代表的結果を示す。
【図１０】非活性化LFLEDA変異を持つhuCD3抗体変異体によるヒト（図10A）およびカニク

イザル（図10B）T細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例5で説明するように決定した。二つ一組にして行った2回の独立した実験からの代表的結果を示す。
【図１１】IgG1-huCD3抗体変異体によるアカゲザルT細胞活性化。PBMC培養におけるアカゲザル由来のT細胞上でのCD69の発現を、実施例6で述べるように、FACS解析によって測定した。
【図１２】huCLB-T3/4抗体の非活性化変異体によるT細胞活性化。PBMCに対してIgG1-huCLB-T3/4変異体をタイトレーションした。PBMC培養におけるT細胞上でのCD69の発現を、実施例7で述べるように、FACS解析によって測定した。3回の実験の代表例を示す。
【図１３】huCLB-T3/4抗体の非活性化変異体によるT細胞増殖。PBMCを抗体と共に3日間インキュベートした後、実施例8で述べるように、細胞増殖ELISAによって増殖を測定した。2回の独立した実験からの代表的結果を示す。
【図１４Ａ】CD3抗体の非活性化抗体変異体が誘発するインビトロT細胞媒介性細胞傷害。抗体変異体（N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DANQ、LFLEDANQPS［図14A～G］）によるT細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例9で説明するように決定した。二つ一組にして行った2回の実験からの平均を示す。
【図１４Ｂ】CD3抗体の非活性化抗体変異体が誘発するインビトロT細胞媒介性細胞傷害。抗体変異体（N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DANQ、LFLEDANQPS［図14A～G］）によるT細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例9で説明するように決定した。二つ一組にして行った2回の実験からの平均を示す。
【図１４Ｃ】CD3抗体の非活性化抗体変異体が誘発するインビトロT細胞媒介性細胞傷害。抗体変異体（N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DANQ、LFLEDANQPS［図14A～G］）によるT細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例9で説明するように決定した。二つ一組にして行った2回の実験からの平均を示す。
【図１４Ｄ】CD3抗体の非活性化抗体変異体が誘発するインビトロT細胞媒介性細胞傷害。抗体変異体（N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DANQ、LFLEDANQPS［図14A～G］）によるT細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例9で説明するように決定した。二つ一組にして行った2回の実験からの平均を示す。
【図１４Ｅ】CD3抗体の非活性化抗体変異体が誘発するインビトロT細胞媒介性細胞傷害。抗体変異体（N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DANQ、LFLEDANQPS［図14A～G］）によるT細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例9で説明するように決定した。二つ一組にして行った2回の実験からの平均を示す。
【図１４Ｆ】CD3抗体の非活性化抗体変異体が誘発するインビトロT細胞媒介性細胞傷害。抗体変異体（N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DANQ、LFLEDANQPS［図14A～G］）によるT細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例9で説明するように決定した。二つ一組にして行った2回の実験からの平均を示す。
【図１４Ｇ】CD3抗体の非活性化抗体変異体が誘発するインビトロT細胞媒介性細胞傷害。抗体変異体（N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DANQ、LFLEDANQPS［図14A～G］）によるT細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例9で説明するように決定した。二つ一組にして行った2回の実験からの平均を示す。
【図１５】非活性化huCLB-T3/4変異体が誘発するインビトロT細胞媒介性細胞傷害。抗体変異体（LFLEDA LAL［図15A～C］によるT細胞媒介性細胞傷害の誘発を、実施例9で述べるように決定した。二つ一組にして行った1回の実験からの平均を示す。
【図１６Ａ】非活性化huCLB-T3/4抗体変異体に対するC1q結合の評価。単一特異性IgG1 huCLB-T3/4（図16A～C）およびbsIgG1-huCLB-T3/4×HER2（図B～D）ならびにその非活性化抗体変異体に対するC1qの結合を、実施例10で述べるようにELISAによって評価した。グラフ中の結果はn＝2の実験の代表例である。
【図１６Ｂ】非活性化huCLB-T3/4抗体変異体に対するC1q結合の評価。単一特異性IgG1 huCLB-T3/4（図16A～C）およびbsIgG1-huCLB-T3/4×HER2（図B～D）ならびにその非活性化抗体変異体に対するC1qの結合を、実施例10で述べるようにELISAによって評価した。グラフ中の結果はn＝2の実験の代表例である。

【図１６Ｃ】非活性化huCLB-T3/4抗体変異体に対するC1q結合の評価。単一特異性IgG1 huCLB-T3/4（図16A～C）およびbsIgG1-huCLB-T3/4×HER2（図B～D）ならびにその非活性化抗体変異体に対するC1qの結合を、実施例10で述べるようにELISAによって評価した。グラフ中の結果はn＝2の実験の代表例である。
【図１６Ｄ】非活性化huCLB-T3/4抗体変異体に対するC1q結合の評価。単一特異性IgG1 huCLB-T3/4（図16A～C）およびbsIgG1-huCLB-T3/4×HER2（図B～D）ならびにその非活性化抗体変異体に対するC1qの結合を、実施例10で述べるようにELISAによって評価した。グラフ中の結果はn＝2の実験の代表例である。
【図１７】非活性化huCLB-T3/4抗体変異体の薬物動態（PK）解析を、実施例11で述べるように、野生型IgG1-huCLB-T3/4抗体のものと比較した。ヒトIgG1の血漿中濃度を時間に対してプロットした（図17A）。図11で述べるように計算した血漿クリアランス率（図17B）。水平の点線は、SCIDマウスにおけるヒトIgG1抗体の平均クリアランス率（10mL/日/kg）を表す。
【図１８】HLA型判定された（HLA-typed）健常ドナーにおける陽性T細胞応答の頻度。増殖アッセイとIL-2分泌アッセイの両方で≧1.9のSI指数を陽性応答とみなした。ヒト化A33を、臨床において高レベルの免疫原性を示し、EpiScreenアッセイにおいて常に20～30％のT細胞応答を誘発する臨床ベンチマーク対照抗体として使用した。PBMCの品質（融解後）をチェックするために、KLH応答を含めた。
【図１９】本発明のヒト化CD3抗体の重鎖（VH）および軽鎖（VL）の配列アラインメント。
【発明を実施するための形態】
【００２４】
詳細な説明
一局面において、本発明は、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体であって、それぞれSEQ ID NO：1、2、および3に示す配列を有する重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3と、それぞれSEQ ID NO：4に示す配列、配列GTN、およびSEQ ID NO：5に示す配列を含む軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、およびCDR3とを含む抗体に関する。
【００２５】
本明細書において使用する用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子のフラグメント、またはそのいずれかの誘導体であって、典型的な生理条件下に、かなりの期間の半減期で、例えば少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、約24時間以上、約48時間以上、約3、4、5、6、7日以上などの期間の半減期で、または他の任意の機能的に定義される期間（例えば、抗原への抗体結合に関連する生理的応答を誘発し、促進し、強化し、かつ/または調整するのに十分な時間、および/または抗体がエフェクター活性を動員するのに十分な時間）の半減期で、抗原に特異的に結合する能力を有するものを指すものとする。抗原と相互作用する結合領域（本明細書では結合ドメインという用語を使用する場合もあり、どちらの用語も同じ意味を有する）は、免疫グロブリン分子の重鎖と軽鎖の両方の可変領域を含む。抗体（Ab）の定常領域は、宿主組織または宿主因子、例えば免疫系のさまざまな細胞（例えばエフェクター細胞およびT細胞）ならびに補体系の構成要素、例えば補体活性化の古典経路における最初の構成要素であるC1qなどへの免疫グロブリンの結合を媒介しうる。上に示したように、本明細書において使用する抗体という用語は、別段の明言がある場合または文脈上明らかに矛盾する場合を除き、抗原に特異的に相互作用する（例えば結合する）能力を保っている抗体のフラグメントを包含する。抗体の抗原結合機能は全長抗体のフラグメントによって発揮されうることが示されている。用語「抗体」に包含される結合性フラグメントの例として、（ｉ）Fab'またはFabフラグメント、V_L、V_H、C_LおよびC_H1ドメインからなる一価フラグメント、またはWO2007059782（Genmab A/S）に記載の一価抗体;（ii）F（ab'）$_2$フラグメント、ヒンジ領域のジスルフィド架橋によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント;（iii）V_HドメインおよびC_H1ドメインから本質的になるFdフラグメント;ならびに（iv）抗体の

単一アームのV_LドメインおよびV_Hドメインから本質的になるFvフラグメントが挙げられる。さらにまた、Fvフラグメントの2つのドメインV_LおよびV_Hは、別個の遺伝子によってコードされているが、組換え法を使用し、それらをV_L領域とV_H領域とがペアになって一価分子を形成している単一のタンパク質鎖にすることを可能にする合成リンカーによって、それらを接合してもよい（一本鎖抗体または一本鎖Fv（scFv）として公知である;例えばBird et al., Science 242, 423-426（1988）およびHuston et al., PNAS USA 85, 5879-5883（1988）参照）。そのような一本鎖抗体は、別段の注記がある場合を除き、または文脈上明確に示される場合を除き、抗体という用語に包含される。そのようなフラグメントは一般に抗体の意味に含まれるが、それらは全体として、またそれぞれ個別に、本発明のユニークな特徴であり、異なる生物学的性質および有用性を呈する。本発明との関連においてこれらの抗体フラグメントおよび他の有用な抗体フラグメントについては、本明細書においてさらに議論する。別段の指定がある場合を除き、抗体という用語がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）、キメラ抗体およびヒト化抗体、ならびに酵素切断、ペプチド合成、および組換え技法などといった任意の公知の方法によって得られる抗原に特異的に結合する能力を保っている抗体フラグメント（抗原結合性フラグメント）も包含することを理解すべきである。作製される抗体は任意のアイソタイプであることができる。

【００２６】

本明細書において使用する用語「免疫グロブリン重鎖」、「免疫グロブリンの重鎖」または「重鎖」は、免疫グロブリンの鎖の一つを指すものとする。重鎖は、典型的には、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略記する）と、免疫グロブリンのアイソタイプを定義づける重鎖定常領域（本明細書ではCHと略記する）とから構成される。重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメインCH1、CH2、およびCH3から構成される。重鎖定常領域はさらにヒンジ領域を含みうる。本明細書において使用する用語「免疫グロブリン」は、2対のポリペプチド鎖からなる構造的に関連する糖タンパク質の一クラスを指すものとし、1対は軽い（L）低分子量鎖、1対は重い（H）鎖であって、4本全てがジスルフィド結合によって相互に連結されうる。免疫グロブリンの構造は詳しく特徴づけられている（例えば［14］参照）。免疫グロブリンの構造では、いわゆる「ヒンジ領域」にあるジスルフィド結合によって2つの重鎖が相互に接続されている。重鎖と同じく各軽鎖も、典型的には、数個の領域、すなわち軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略記する）と軽鎖定常領域（本明細書ではCLと略記する）とから構成される。軽鎖定常領域は、典型的には、1つのドメインCLから構成される。また、VH領域とVL領域は、相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる超可変性領域（すなわち配列および/または構造的に画定されるループの形態が超可変性でありうる超可変領域）に、さらに細分することができ、それらの間には、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる保存度の高い領域が散在している。VHとVLは、それぞれ典型的には、3つのCDRと4つのFRから構成され、それらがアミノ末端からカルボキシ末端に向かって次の順序で配置されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4（［15］参照）。CDR配列は、IMGTが提供する方法を使用して決定することができる［16］～［17］。

【００２７】

本明細書において使用する用語「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラス（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM）またはその任意のアロタイプ、例えばIgG1m（za）およびIgG1m（f）［SEQ ID NO：15］）を指す。したがって、一態様において抗体は、IgG1クラスまたはその任意のアロタイプの免疫グロブリン重鎖を含む。さらに、各重鎖アイソタイプを、カッパ（κ）軽鎖またはラムダ（λ）軽鎖と組み合わせることができる。

【００２８】

本明細書において使用する用語「キメラ抗体」は、可変領域が非ヒト種に由来し（例えば齧歯類に由来し）、定常領域がヒトなどの異なる種に由来する抗体を指す。キメラ抗体は抗体工学によって作製することができる。「抗体工学」とは、さまざまな種類の抗体修飾に広く使用される用語であり、当業者には周知のプロセスである。特にキメラ抗体は、

［18］に記載の標準的DNA技法を使って作製することができる。したがってキメラは遺伝子的または酵素的に操作された組換え抗体でありうる。キメラ抗体の作製は当業者に知られているので、本発明のキメラ抗体の作製は、本明細書に記載する方法以外の方法で行うこともできる。治療用のキメラモノクローナル抗体は抗体免疫原性を低減するために開発される。それらは、典型的には、関心対象の抗原に特異的な非ヒト（例えばマウス）可変領域と、ヒト定常抗体重鎖および軽鎖ドメインとを含有しうる。キメラ抗体に関連して使用する用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の両方のCDRおよびフレームワーク領域を含む領域を指す。

【００２９】

本明細書において使用する用語「ヒト化抗体」は、ヒト抗体定常ドメインと、ヒト可変ドメインに対して高レベルの配列相同性を持つように修飾された非ヒト可変ドメインとを含有する、遺伝子操作された非ヒト抗体を指す。これは、全体として抗原結合部位を形成する6つの非ヒト抗体相補性決定領域（CDR）を相同ヒトアクセプターフレームワーク領域（FR）上に移植することによって、達成することができる（［19］～［20］参照）。親抗体の結合アフィニティーおよび特異性を完全に再構成するには、親抗体（すなわち非ヒト抗体）からのフレームワーク残基をヒトフレームワーク領域中に置換すること（復帰変異）が必要かもしれない。構造相同性モデリングは、抗体の結合特性にとって重要なフレームワーク領域中のアミノ酸残基を同定するのに役立ちうる。したがってヒト化抗体は、非ヒトCDR配列、任意で非ヒトアミノ酸配列への1つまたは複数のアミノ酸復帰変異を含む主としてヒトのフレームワーク領域、および完全にヒトの定常領域を含みうる。任意で、アフィニティーや生化学的特性などの好ましい特徴を持つヒト化抗体を得るために、必ずしも復帰変異ではない追加のアミノ酸修飾を適用してもよい。

【００３０】

本発明のいずれかの局面または態様によるヒト化またはキメラ抗体は、「ヒト化またはキメラCD3抗体」、「本発明のヒト化またはキメラ抗体」、「CD3抗体」、または「本発明のCD3抗体」と呼ぶことができ、これらは全て、文脈上矛盾が生じる場合を除き、同じ意味および目的を有する。

【００３１】

非ヒト起源の抗体のアミノ酸配列はヒト起源の抗体とは異なるので、ヒト患者に投与した場合に非ヒト抗体は潜在的に免疫原性である。しかし、抗体が非ヒト起源であるにもかかわらず、そのCDRセグメントはそのターゲット抗原に結合する抗体の能力を担っており、ヒト化はその抗体の特異性および結合アフィニティーを維持することを目指している。このように非ヒト治療用抗体のヒト化は、人間におけるその免疫原性を最小限に抑えると同時に、そのヒト化抗体が非ヒト起源の抗体の特異性および結合アフィニティーを維持するように行われる。

【００３２】

本明細書において使用する用語「結合領域」は、抗体の一領域であって、例えば細胞、細菌またはビリオン上に存在するポリペプチドなどといった何らかの分子に結合する能力を有する領域を指す。

【００３３】

本明細書において使用する用語「結合」は、前もって決定された抗原またはターゲットへの抗体の結合を指し、その抗原またはターゲットへの結合は、例えば表面プラズモン共鳴（SPR）技術により、BIAcore 3000計器において、抗原をリガンドとし、かつ抗体を分析物として決定した場合に、典型的には、約10^{-6}M以下、例えば10^{-7}M以下、例えば約10^{-8}M以下、例えば約10^{-9}M以下、約10^{-10}M以下、または約10^{-11}M以下のK_Dに相当するアフィニティーで起こり、前もって決定された抗原でも近縁の抗原でもない非特異的抗原（例えばBSA、カゼイン）に対する結合に関するそのアフィニティーの10分の1以下、例えば100分の1以下、例えば1,000分の1以下、例えば10,000分の1以下、例えば100,000分の1以下のK_Dに相当するアフィニティーで前もって決定された抗原に結合する。アフィニティーがどの程度低いかはその抗体のK_Dに依存するので、抗体のK_Dが非常に低い場合（すなわち抗体が

高度に特異的である場合）、抗原に対するアフィニティーの低さは、非特異的抗原に対するアフィニティーと比較して、10,000分の1以下になりうる。本明細書において使用する用語「K_D」（M）は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指す。

【００３４】

本明細書において使用する用語「ヒトCD3」は、T細胞補助受容体タンパク質複合体の一部であって4つの異なる鎖から構成されているヒト分化抗原群3タンパク質を指す。CD3は他の種にも見出されるので、本明細書において使用する用語「CD3」は、文脈上矛盾が生じる場合を除き、ヒトCD3に限定されない。哺乳動物の場合、この複合体は、CD3γ（ガンマ）鎖（ヒトCD3γ鎖Swissprot P09693またはカニクイザルCD3γ Swissprot Q95LI7）、CD3δ（デルタ）鎖（ヒトCD3δ Swissprot P04234またはカニクイザルCD3δSwissprot Q95LI8）、2つのCD3ε（イプシロン）鎖（ヒトCD3ε Swissprot P07766、またはカニクイザルCD3ε Swissprot Q95LI5、またはアカゲザルCD3ε Swissprot G7NCB9）およびCD3ζ（ゼータ）鎖（ヒトCD3ζ Swissprot P20963、カニクイザルCD3ζ Swissprot Q09TK0）を含有している。これらの鎖は、T細胞受容体（TCR）として公知である分子と会合して、Tリンパ球において活性化シグナルを生成する。TCR分子とCD3分子は共にTCR複合体を構成する。

【００３５】

Swissprot番号として言及されるアミノ酸配列がタンパク質の翻訳後に除去されるシグナルペプチドを含むことは、当業者には知られている。したがって、細胞表面上に存在するCD3などのタンパク質はシグナルペプチドを含まない。特に、表1に列挙するアミノ酸配列は、そのようなシグナルペプチドを含有していない。表1に列挙するようなタンパク質は「成熟タンパク質」と呼ぶことができる。したがってSEQ ID NO：14は、成熟ヒトCD3δ（デルタ）のアミノ酸配列を表し、SEQ ID NO：13は成熟ヒトCD3ε（イプシロン）のアミノ酸配列を表し、SEQ ID NO：21は成熟カニクイザルCD3εのアミノ酸配列を表し、SEQ ID NO：23は成熟アカゲザルCD3εのアミノ酸配列を表す。このように本明細書において使用する用語「成熟」は、シグナル配列またはリーダー配列を一切含まないタンパク質を指す。

【００３６】

シグナルペプチド配列の相同性、長さ、および切断部位位置が、タンパク質によってかなり多様であることは周知である。シグナルペプチドは異なる方法で決定することができ、例えば本発明のSEQ ID NO：13はSignalPアプリケーション（http ://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/で利用可能）に従って決定された。

【００３７】

ある特定態様では、本発明のヒト化またはキメラ抗体が、CD3のイプシロン鎖、例えばヒトCD3のイプシロン鎖（SEQ ID NO：13）に結合する。さらに別の特定態様では、本ヒト化またはキメラ抗体が、ヒトCD3ε（イプシロン）（SEQ ID NO：13）のN末端部分のアミノ酸1～27内のエピトープに結合する。そのような特定態様において、抗体は、さらに、他の非ヒト霊長類種、例えばカニクイザル（カニクイザルCD3イプシロンSEQ ID NO：21）および/またはアカゲザル（アカゲザルCD3イプシロンSEQ ID NO：23）と交差反応しうる。

【００３８】

本明細書において使用する用語「交差反応する」は、本発明のヒト化またはキメラ抗体などといった抗体の、異なる種のそのターゲットに結合する能力を指す。具体的には、本明細書に記載する実施例で例示するヒト化CD3抗体は、ヒトCD3（実施例2）、カニクイザルCD3（実施例2）およびアカゲザルCD3に結合する能力を有する。

【００３９】

本明細書において定義づけるCDR配列を含み、さらにフレームワーク領域を含む本発明の抗体は、CDR配列外の配列が相違しうるが、それでも元の抗体と比較して完全な結合能力を保っている。したがって本発明は、本明細書に記載するいずれかの配列と一定の配列同一性を有する可変領域のアミノ酸配列を含む抗体にも関係する。

【００４０】
本発明との関連において使用する用語「配列同一性」は、2つの配列を最適に整列するために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、それらの配列が共有する同一位置の数の関数としての2つの配列の間のパーセント同一性を指す（すなわち％相同性＝100×同一位置の数/位置の総数）。2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の間のパーセント同一性は、例えばE. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム［21］を使って決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズム［22］を使って決定することもできる。多重アラインメントは、好ましくは、（例えばVector NTI Advance（登録商標）ソフトウェアバージョン11.5（Invitrogen Inc.）で使用されている）Clustal Wアルゴリズム［23］を使って行われる。
【００４１】
したがって一態様において、VH領域は、
a）SEQ ID NO：6に示すVH配列;
b）SEQ ID NO：8に示すVH配列;
c）SEQ ID NO：7に示すVH配列;および
d）SEQ ID NO：9に示すVH配列
からなる群より選択されるVH配列に示す少なくとも1つのアミノ酸配列に対して、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％のアミノ酸配列同一性を有する。
【００４２】
一特定態様において、VH領域は、
a）SEQ ID NO：6に示すVH配列;
b）SEQ ID NO：8に示すVH配列;
c）SEQ ID NO：7に示すVH配列;および
d）SEQ ID NO：9に示すVH配列
からなる群より選択されるVH配列に示す少なくとも1つのアミノ酸配列に対して、少なくとも96％のアミノ酸配列同一性を有する。
【００４３】
一態様において、VL領域は、
a）SEQ ID NO：10に示すVL配列;
b）SEQ ID NO：11に示すVL配列;および
c）SEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択されるVL配列に示す少なくとも1つのアミノ酸配列に対して、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％のアミノ酸配列同一性を有する。
【００４４】
一特定態様において、VL領域は、
a）SEQ ID NO：10に示すVL配列;
b）SEQ ID NO：11に示すVL配列;および
c）SEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択されるVL配列に示す少なくとも1つのアミノ酸配列に対して、少なくとも95％のアミノ酸配列同一性を有する。
【００４５】
一態様において、VH領域は、
a）SEQ ID NO：6に示すVH配列;
b）SEQ ID NO：8に示すVH配列;
c）SEQ ID NO：7に示すVH配列;および
d）SEQ ID NO：9に示すVH配列
からなる群より選択される。

【００４６】
一態様において、VL領域は
a）SEQ ID NO：10に示すVL配列;
b）SEQ ID NO：11に示すVL配列;および
c）SEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択される。
【００４７】
一態様では、VH配列またはVL配列のどちらか一方だけが、本明細書に開示する配列の一つに対して100％同一であり、他方は、本明細書に開示する配列の一つに対して、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％のアミノ酸配列同一性という配列同一性を有する。
【００４８】
一特定態様において、VH配列は、
a）SEQ ID NO：6に示すVH配列;
b）SEQ ID NO：7に示すVH配列;
c）SEQ ID NO：8に示すVH配列;および
d）SEQ ID NO：9に示すVH配列
からなる群より選択されるVH配列に示す少なくとも1つのアミノ酸配列に対して、少なくとも97％のアミノ酸配列同一性を有し、VL配列は、
i）SEQ ID NO：10に示すVL配列;
ii）SEQ ID NO：11に示すVL配列;および
iii）SEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択されるVL配列に示す少なくとも1つのアミノ酸配列に対して、少なくとも95％のアミノ酸配列同一性を有する。
【００４９】
一態様において、VH配列およびVL配列は、以下に示す配列からなる群より選択される：
a）それぞれSEQ ID NO：6および10;それぞれSEQ ID NO：7および10;それぞれSEQ ID NO：8および10;それぞれSEQ ID NO：9および10;それぞれSEQ ID NO：6および11;それぞれSEQ ID NO：7および11;それぞれSEQ ID NO：8および11;それぞれSEQ ID NO：9および11;それぞれSEQ ID NO：6および12;それぞれSEQ ID NO：7および12;それぞれSEQ ID NO：8および12;ならびにそれぞれSEQ ID NO：9および12に示す配列に対して、少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびVL配列;
b）それぞれSEQ ID NO：6および10;それぞれSEQ ID NO：7および10;それぞれSEQ ID NO：8および10;それぞれSEQ ID NO：9および10;それぞれSEQ ID NO：6および11;それぞれSEQ ID NO：7および11;それぞれSEQ ID NO：8および11;それぞれSEQ ID NO：9および11;それぞれSEQ ID NO：6および12;それぞれSEQ ID NO：7および12;それぞれSEQ ID NO：8および12;ならびにそれぞれSEQ ID NO：9および12に示す配列に対して、少なくとも95％の同一性を有するVH配列およびVL配列;
c）それぞれSEQ ID NO：6および10;それぞれSEQ ID NO：7および10;それぞれSEQ ID NO：8および10;それぞれSEQ ID NO：9および10;それぞれSEQ ID NO：6および11;それぞれSEQ ID NO：7および11;それぞれSEQ ID NO：8および11;それぞれSEQ ID NO：9および11;それぞれSEQ ID NO：6および12;それぞれSEQ ID NO：7および12;それぞれSEQ ID NO：8および12;ならびにそれぞれSEQ ID NO：9および12に示す配列に対して、少なくとも97％の同一性を有するVH配列およびVL配列;
d）それぞれSEQ ID NO：6および10;それぞれSEQ ID NO：7および10;それぞれSEQ ID NO：8および10;それぞれSEQ ID NO：9および10;それぞれSEQ ID NO：6および11;それぞれSEQ ID NO：7および11;それぞれSEQ ID NO：8および11;それぞれSEQ ID NO：9および11;それぞれSEQ ID NO：6および12;それぞれSEQ ID NO：7および12;それぞれSEQ ID NO：8および12;ならびにそれぞれSEQ ID NO：9および12に示す配列に対して、少なくとも99％の同一性を有するVH配列およびVL配列;

e）それぞれSEQ ID NO：6および10;それぞれSEQ ID NO：7および10;それぞれSEQ ID NO：8および10;それぞれSEQ ID NO：9および10;それぞれSEQ ID NO：6および11;それぞれSEQ ID NO：7および11;それぞれSEQ ID NO：8および11;それぞれSEQ ID NO：9および11;それぞれSEQ ID NO：6および12;それぞれSEQ ID NO：7および12;それぞれSEQ ID NO：8および12;ならびにそれぞれSEQ ID NO：9および12に示す配列に対して、少なくとも100％の同一性を有するVH配列およびVL配列;

f）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95％の同一性を有するVL配列;

g）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列;

h）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列;

i）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列;

j）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列;

k）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列;

l）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列;

m）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列;

n）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列;

o）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列;

p）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列;

q）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列;

r）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列;

s）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列;

t）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列;

u）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列;

v）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列;

x）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列;

y）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列;

z）SEQ ID NO：6に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列;

aa）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95％の同一性を有するVL配列;

ab）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列;

ac）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
ad）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
ae）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
af）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列；
ag）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
ah）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
ai）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
aj）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列；
ak）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
al）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
am）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
an）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列；
ao）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列；
ap）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
aq）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
ar）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列；
as）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列；
at）SEQ ID NO：7に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
ba）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95％の同一性を有するVL配列；
bb）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列；
bc）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
bd）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも90％の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
be）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
bf）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列；
bg）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；

bh）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
bi）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
bj）SEQ ID NO：に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列；
bk）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
bl）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
bm）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
bn）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列；
bo）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列；
bp）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
bq）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
br）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列；
bs）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列；
bt）SEQ ID NO：8に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
ca）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列；
cb）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列；
cc）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
cd）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
ce）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
cf）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列；
cg）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
ch）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；
ci）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列；
cj）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列；
ck）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列；
cl）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列；

cm）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列;
cn）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列;
co）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列;
cp）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVL配列;
cq）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも90%の同一性を有するVL配列;
cr）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも95%の同一性を有するVL配列;
cs）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも97%の同一性を有するVL配列;
ならびに
ct）SEQ ID NO：9に示す配列に対して少なくとも100%の同一性を有するVH配列およびSEQ ID NO：10、11、または12に示す配列に対して少なくとも99%の同一性を有するVL配列。

【００５０】

一態様において、結合領域は、
a）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列;
b）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL;
c）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列;
d）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列;
e）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列;
f）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列;
g）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列;
h）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列;
i）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列;
j）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列;
k）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列;および
l）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択されるVHおよびVLを含む。

【００５１】

ある特定態様において、結合領域は、
a）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列;
b）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列;および
c）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列
からなる群より選択されるVH配列およびVL配列を含む。

【００５２】

本発明のヒト化抗体は、ヒト可変フレームワーク領域として使用するのに適度な相同性を有する重鎖および軽鎖ヒト配列を同定するために、重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列をヒト生殖細胞系可変領域配列のデータベースと比較することによって、作製することができる。一連のヒト化重鎖および軽鎖可変領域は、例えばマウスのCDRをフレームワーク領域（上述のように同定されるもの）に移植し、必要であれば、抗体結合効率の回復にとって決定的に重要であるかもしれないと同定された残基をその特定マウス配列に復帰変異させること（フレームワーク領域中のヒトアミノ酸残基の1つまたは複数をその特定位置の非ヒトアミノ酸に戻すように変異させること）によって設計することができる。次に、iTope（商標）およびTCED（商標）（［24］、［25］、および［26］）などのインシリコ技術の適用によって決定される、潜在的T細胞エピトープの出現率が最低である変異体配列を選択することができる。

【００５３】
さらに、本発明のヒト化抗体を「脱免疫化」（deimmunize）することもできる。本発明のヒト化抗体のようなタンパク質配列内での、ヒトT細胞エピトープの存在は、それらがヘルパーT細胞を活性化する潜在能力を有することから、免疫原性リスクプロファイルを増大させる可能性があるので、脱免疫化（deimmmunization）が望ましいかもしれない。ヘルパーT細胞のそのような活性化は脱免疫化によって回避することができる。脱免疫化は、抗体の結合アフィニティーを著しく低減することなくT細胞エピトープを除去するために、ヒト化抗体のアミノ酸配列に変異を導入することによって行うことができる。
【００５４】
したがって本発明の一態様では、（i）非ヒト全可変重鎖配列および/または全可変軽鎖配列をヒト生殖細胞系配列のデータベースと比較する工程、（ii）非ヒト配列に対して最も高い相同性を有するヒト生殖細胞系配列を選択することでヒト化配列を得る工程、（iii）必要であれば復帰変異によってヒト化配列を最適化する工程、および（iv）適切な発現系において前記配列を発現させる工程を含む方法によって、ヒト化抗体を生産することができる。
【００５５】
したがって、本発明の全長抗体は、（i）非ヒト可変重鎖配列および可変軽鎖配列をヒト生殖細胞系配列のデータベースと比較する工程、（ii）非ヒト配列に対して最も高い相同性を有するヒト生殖細胞系配列を選択する工程、（iii）選択したヒト生殖細胞系中に非ヒトCDRを移植することでヒト化配列を得る工程、（iv）必要であれば復帰変異によってヒト化配列を最適化する工程、（v）定常重鎖および軽鎖配列を同定する工程、および（vi）適切な発現系において完全重鎖配列および完全軽鎖配列を発現させる工程を含む方法によって生産することができる。したがって本発明の全長抗体は、実施例1で述べるように生産することができる。CDR配列または全可変領域配列のいずれかから出発して全長抗体を生産することは、当業者には知られている。したがって、本発明の全長抗体を作製する方法は、当業者にはわかるであろう。
【００５６】
本明細書において使用する用語「完全重鎖配列」は、可変重鎖配列と定常重鎖配列とからなる配列を指す。
【００５７】
本明細書において使用する用語「完全軽鎖配列」は、可変軽鎖配列と定常軽鎖配列とからなる配列を指す。
【００５８】
復帰変異は標準的DNA変異誘発法によって導入することができる。そのようなDNA変異誘発の標準的技法は［18］に記載されている。あるいは、Quickchange（商標）Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene）などの市販のキットを使用するか、デノボDNA合成によって所望の復帰変異を導入することができる。
【００５９】
したがって一態様では抗体がヒト化抗体である。
【００６０】
キメラ抗体は、非ヒト（例えばマウス）抗体の定常領域配列の全てをヒト起源の定常領域配列で置換することによって作製することができる。したがって、キメラ抗体には完全に非ヒトの可変領域配列が維持される。したがって本発明のキメラ抗体は、適切な発現系において非ヒト可変重鎖（SEQ ID NO：27）、非ヒト可変軽鎖配列（SEQ ID NO：28）、ヒト定常重鎖配列およびヒト定常軽鎖配列を発現させ、それによって全長キメラ抗体を作製する工程を含む方法によって生産することができる。代替的方法を使用することもできる。キメラ抗体を生産するそのような方法は当業者に知られているので、本発明のキメラ抗体の生産方法は当業者にはわかるであろう。
【００６１】
したがって一態様では抗体がキメラ抗体である。

【００６２】
一態様では、抗体が全長抗体である。本明細書において使用する用語「全長抗体」は、当該アイソタイプの野生型抗体に通常見出されるものに対応する重鎖および軽鎖定常および可変ドメインを全て含有する抗体（例えば親抗体または変異体抗体）を指す。
【００６３】
一態様において、抗体は、第1および第2免疫グロブリン重鎖を含むFc領域を含む。
【００６４】
本明細書において使用する用語「Fc領域」は、N末端からC末端に向かう方向に、少なくともヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域を含む領域を指す。Fc領域はヒンジ領域のN末端側にCH1領域をさらに含みうる。
【００６５】
本明細書において使用する用語「ヒンジ領域」は、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を指す。したがって、例えばヒトIgG1抗体のヒンジ領域は、Kabatに記載のEuナンバリングでアミノ酸216～230に対応する。
【００６６】
別段の明言がある場合を除き、または文脈上矛盾が生じる場合を除き、定常領域配列のアミノ酸は、本明細書では、Euナンバリングインデックス（Eu-index of numbering）（［27］に記載）に従ってナンバリングされ、これを「Kabatに記載のEuナンバリングで」、「KabatのEuナンバリングで」、または「Euナンバリングシステムで」という。
【００６７】
本明細書において使用する用語「CH1領域」または「CH1ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のCH1領域を指す。したがって例えばヒトIgG1抗体のCH1領域は、Euナンバリングシステムでアミノ酸118～215に対応する。ただし、CH1領域は本明細書に記載する他のサブタイプのいずれであってもよい。
【００６８】
本明細書において使用する用語「CH2領域」または「CH2ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のCH2領域を指す。したがって例えばヒトIgG1抗体のCH2領域はEuナンバリングシステムでアミノ酸231～340に対応する。ただし、CH2領域は本明細書に記載する他のサブタイプのいずれであってもよい。
【００６９】
本明細書において使用する用語「CH3領域」または「CH3ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のCH3領域を指す。したがって例えばヒトIgG1抗体のCH3領域はEuナンバリングシステムでアミノ酸341～447に対応する。ただし、CH3領域は本明細書に記載する他のサブタイプのいずれであってもよい。
【００７０】
一態様では、免疫グロブリン重鎖のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択される。免疫グロブリン重鎖は、IgG1m（ｆ）（SEQ ID NO：15）など、各免疫グロブリンクラス内の任意のアロタイプであることができる。したがって、一特定態様では、免疫グロブリン重鎖のアイソタイプが、IgG1またはその任意のアロタイプ、例えばIgG1m（ｆ）（SEQ ID NO：15）である。
【００７１】
T細胞受容体（TCR）の一部である抗原CD3を標的とする場合は、T細胞特異的な細胞殺滅機序が望ましい。他のエフェクター機能、例えば補体活性化は必要ではないだろうから、エフェクター機能の低減が望ましい。C1q結合は補体カスケードにおける第1段階であるため、抗体の補体依存性細胞傷害（CDC）能の指標として役立つ。抗体に対するC1qの結合を回避することができれば、補体カスケードの活性化も回避することができる。
【００７２】
したがって一態様では、抗体が、該抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、少なくとも99％、または100％低減するように修飾されたFc領域を含み、ここではC1q結合がELIS

Aによって決定される。

【００７３】

本明細書において使用する用語「修飾された」は、野生型Fc領域のアミノ酸配列とは同一でないFc領域のアミノ酸配列を指す。すなわち、例えばC1qの結合部位、他のエフェクター分子の結合部位、またはFc受容体（FcR）に対する結合などを改変するために、野生型Fc領域の特定位置にあるアミノ酸残基が置換され、欠失し、または挿入されている。アミノ酸配列のそのような修飾は、1つまたは複数のアミノ酸を保存的アミノ酸で置換することによって調製するか、1つまたは複数のアミノ酸を、野生型に存在するアミノ酸と物理的および/または機能的に類似する代替アミノ酸で置換することによって調製することができる。非保存的アミノ酸で置換することによって置換を調製することもできる。

【００７４】

本発明に関して、アミノ酸は保存的アミノ酸または非保存的アミノ酸と記述することができ、したがってアミノ酸を相応に分類することができる。アミノ酸残基は、代替的な物理的性質および機能的性質によって画定されるクラスに分類することもできる。したがってアミノ酸のクラスは、以下の表の1つまたは両方に反映させることができる。

【００７５】

保存的クラスのアミノ酸残基

酸性残基	DおよびE
塩基性残基	K, R, およびH
親水性非荷電残基	S, T, N, およびQ
脂肪族非荷電残基	G, A, V, L, およびI
非極性非荷電残基	C, M, およびP
芳香族残基	F, Y, およびW

アミノ酸残基の代替的な物理的および機能的分類

アルコール基含有残基	SおよびT
脂肪族残基	I, L, V, およびM
シクロアルケニル関連残基	F, H, W, およびY
疎水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, およびY
負荷電残基	DおよびE
極性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, およびT
正荷電残基	H, K, およびR
小残基	A, C, D, G, N, P, S, T, およびV
極小残基	A, G, およびS
ターン形成に関与する残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P,およびT
フレキシブル残基	Q, T, K, S, G, P, D, E, およびR

【００７６】

本発明に関して、ヒト化またはキメラ抗体などの抗体における置換は、

元のアミノ酸-位置-置換アミノ酸

の形で示される。

【００７７】

よく知られているアミノ酸の命名法を参照して、任意のアミノ酸残基を示すための記号XaaおよびXを含む三文字記号または一文字記号を使用する。したがって「L234F」または「Leu234Phe」という表記は、抗体がアミノ酸位置234に、フェニルアラニンによるロイシンの置換を含むことを意味する。

【００７８】
所与の位置におけるアミノ酸の他の任意のアミノ酸への置換は、
元のアミノ酸-位置、すなわち例えば「L234」
と言及される。
【００７９】
元のアミノ酸および/または置換アミノ酸が2つ以上のアミノ酸を含みうるが、全てのアミノ酸を含むわけではない修飾については、それら2つ以上のアミノ酸を「,」または「/」によって区切ることができる。例えば、位置234におけるフェニルアラニン、アルギニン、リジンまたはトリプトファンによるロイシンの置換は、「Leu234Phe,Arg,Lys,Trp」または「Leu234Phe/Arg/Lys/Trp」または「L234F,R,K,W」または「L234F/R/K/W」または「L234→F,R,KまたはW」である。
【００８０】
本発明についてはこのような指定を可換的に使用しうるが、それらは同じ意味と目的を有する。
【００８１】
さらにまた、「置換」という用語は、他の19種類の天然アミノ酸のいずれか一つへの、または他のアミノ酸、例えば非天然アミノ酸への置換を包含する。例えば位置234におけるアミノ酸Lの置換には以下の置換のそれぞれが含まれる：234A、234C、234D、234E、234F、234G、234H、234I、234K、234M、234N、234Q、234R、234S、234T、234V、234W、234P、および234Y。なお、これは234Xという指定に等しく、ここではXが元のアミノ酸以外の任意のアミノ酸を指定している。これらの置換は、L234A、L234Cなど、またはL234A,Cなど、またはL234A/C/などと指定することもできる。同じことが、本明細書において言及するありとあらゆる位置に、同様に当てはまり、そのような置換のいずれか一つが具体的に本明細書に含まれる。
【００８２】
本発明の抗体はアミノ酸残基の欠失も含みうる。そのような欠失は「del」で表され、例えばL234delのような記述が含まれる。したがってそのような態様では、位置234のロイシンがアミノ酸配列から欠失している。
【００８３】
「アミノ酸」および「アミノ酸残基」という用語は、本明細書では、可換的に使用されうる。
【００８４】
本明細書において使用する用語「C1q結合」は、抗体がその抗原に結合している時の、該抗体へのC1qの結合を指す。本明細書において使用する用語「その抗原に結合している」とは、インビボでもインビトロでも、抗体のその抗原への結合を指す。
【００８５】
C1q結合についていう場合、本明細書において使用する用語「低減する」は、野生型抗体へのC1q結合と比較した場合に、抗体へのC1qの結合を低減し、最小限にし、または完全に阻害する本発明抗体の能力を指す。
【００８６】
本発明の抗体の比較アッセイにおける使用に関して本明細書において使用する用語「野生型抗体」は、不活性でない点以外は被験抗体と同一である抗体を指す。この文脈において「不活性」という用語は、実施例10において決定されるC1qの結合が（すなわちC1q結合をELISAによって決定した場合に）低減しているか存在しない、修飾Fc領域;実施例4において決定されるFc媒介T細胞増殖が（すなわちT細胞増殖を末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイで測定した場合に）低減しているか存在しない、修飾Fc領域;および/または実施例3において決定されるFc媒介CD69発現が（すなわちFc媒介CD69発現をPBMCに基づく機能アッセイにおいて決定した場合に）低減しているか存在しない、修飾Fc領域を指す。したがって野生型抗体は、免疫グロブリン重鎖中に天然のアミノ酸を含む。すなわち、例えばC1q、Fc受容体などと相互作用する抗体の能力を改変または低減するかもしれないア

ミノ酸修飾を何も含まない抗体である。したがってそのような野生型抗体は、例えばC1qに結合することができる活性化抗体のままであるだろう。野生型抗体および本発明の抗体は、抗体を二重特異性抗体にするなどの目的で、エフェクター機能を誘発する抗体の能力に影響を及ぼすアミノ酸修飾ではない他のアミノ酸修飾を含みうる。

【００８７】

本明細書において使用する用語「ELISA」は、抗体と色の変化を使って物質を同定する試験である酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay）を指す。第1の特異的抗体をプレート表面に取り付ける。そうすることにより、試料からのタンパク質を加えて、該第1の特異的抗体への結合を調べる。試料からの抗体に結合する第2抗体を加える。第2抗体は酵素に連結されており、最終工程では、酵素の基質を含有する物質が加えられる。その後の反応により、検出可能なシグナル（最も一般的には基質の色の変化）が生じる。ELISAの概念は当技術分野において周知であり、ELISAを実施するさまざまな方法は、本発明の抗体を評価するための方法の一部であると考えられる。したがって、この説明を限定と理解してはならない。というのも、実施例4に記載するように、さまざまな形態のELISAを実施することができるからである。

【００８８】

具体的に述べると、C1qに結合する本発明の抗体の能力は、（i）該抗体を96ウェルプレートにコーティングする工程、（ii）3%血清を加える工程、（iii）抗ヒトC1q抗体を加える工程、（iv）プレートを発色させる工程、および（v）OD_{405nm}を測定する工程を含むELISAによって決定することができる。したがって一態様において、抗体は、該抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または100%低減するように修飾されたFc領域を含み、ここではC1q結合が、（i）該抗体を96ウェルプレートにコーティングする工程、（ii）3%血清を加える工程、（iii）抗ヒトC1q抗体を加える工程、（iv）プレートを発色させる工程、および（v）OD_{405nm}を測定する工程を含むELISAによって決定される。したがって特定態様では、C1qの結合が実施例10で述べるように評価される。

【００８９】

本明細書において使用する用語「Fc受容体」または「FcR」は、一定の細胞の表面に見出されるタンパク質を指す。FcRは抗体のFc領域に結合する。FcRには、それらが認識する抗体のタイプに基づいて分類される数種類の異なるタイプが存在する。例えばFcγ（ガンマ）受容体はIgGクラスの抗体に結合する。

【００９０】

本明細書において使用する用語「Fcγ受容体」、「Fcガンマ受容体」または「FcγR」は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するFc受容体の一群を指し、オプソニン化（被覆）微生物の貪食を誘発するのに最も重要なFc受容体である。このファミリーには、分子構造が異なるために抗体アフィニティーが異なるいくつかのメンバー、FcγRI（CD64）、FcγRIIa（CD32a）、FcγRIIb（CD32b）、FcγRIIIa（CD16a）、FcγRIIIb（CD16b）が含まれる。

【００９１】

Fcが媒介するエフェクター機能は、ヒト免疫グロブリンG（IgG）分子の生物学的活性の一部を形成する。そのようなエフェクター機能の例としては、例えば、Fc領域へのさまざまなエフェクター分子の結合によって引き金が引かれる抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）および補体依存性細胞傷害（CDC）が挙げられる。本発明に関して「Fc結合」、「Fc受容体結合」、「FcR結合」、および「FcRに対する抗体Fc領域の結合」は、Fc受容体（FcR）またはエフェクター分子へのFc領域の結合を指す。用語「FcγR結合」および「FcγRI結合」は、それぞれFcガンマ受容体およびFcガンマ受容体IへのFc領域の結合を指す。CD3抗体がT細胞に結合すると、CD3抗体の野生型Fc領域は他の細胞上、例えば単球上に存在するFcRに結合し、それが、T細胞の非特異的Fc媒介活性化につながる。T細胞のそのような非特異的Fc媒介活性化は、望ましくないだろう。T細胞は、標的（またはターゲット特異的）T細胞活性化によっても活性化されうる。そのような標的T細胞活性化は、がんなど

の、ある範囲の適応症の処置には、非常に望ましいであろう。本明細書において使用する用語「標的T細胞活性化」は、腫瘍細胞上の腫瘍ターゲットなどといった特異的ターゲットに結合する第1結合領域とCD3などのT細胞特異的ターゲットに結合する第2結合領域とを含む二重特異性抗体を使用することによって、T細胞を腫瘍細胞などの特異的細胞に向かわせることを指す。したがって、一方の結合領域がT細胞上に存在するCD3に結合し、かつ他方の結合領域が例えば腫瘍細胞上のターゲット特異的抗原に結合する二重特異性抗体を使用することによって、腫瘍細胞などの特異的細胞へのT細胞のターゲティングを容易にすることができる。非特異的Fc媒介T細胞活性化は依然として考えられるので、Fc媒介架橋によるそのような望ましくない非特異的Fc媒介T細胞活性化は回避すべきであり、そのような活性に関してFc領域を不活性にすることによって無効にすることができる。これにより、該不活性Fc領域と存在するFc受容体の間の相互作用が防止される。本発明のヒト化抗体は、いくつかの異なるアッセイにおいて試験したところ、不活性であることが判明した。すなわち実施例3～5を参照されたい。Fc領域中にアミノ酸修飾を有する別の被験CD3抗体huCLB-T3/4も、異なるアッセイで試験したところ、不活性であることがわかった。すなわち実施例7～10を参照されたい。実施例で述べるようにアミノ酸置換L234F、L235E、およびD265Aを含む本発明のヒト化CD3抗体は、T細胞上の低レベルなCD69発現（実施例3）、Fc媒介T細胞増殖の阻止（実施例4）、および二重特異性抗体の形態での非特異的ターゲット殺滅なし（実施例5）を示した。このように、本発明のヒト化抗体は、野生型抗体と比較して、いくつかのアッセイにおいて優れた結果を示す。

【００９２】

本発明の抗体はFc領域中に修飾を含みうる。抗体がそのような修飾を含む場合、その抗体は不活性抗体または非活性化抗体になりうる。本明細書において使用する用語「不活性であること」、「不活性」または「非活性化」は、少なくともどのFcγ受容体にも結合することができず、FcRのFc媒介架橋を誘発することができず、または個々の抗体の2つのFc領域によるターゲット抗原のFcR媒介架橋を誘発することができず、あるいはC1qに結合することができないFc領域を指す。ヒト化またはキメラCD3抗体のFc領域が不活性であることは、単一特異性フォーマットの抗体を使って試験すると好都合であるが、そうして同定された不活性Fc領域は、二重特異性または他のヒト化もしくはキメラ多重特異性CD3抗体に使用することができる。

【００９３】

治療用抗体開発を目的として、Fcガンマ受容体およびC1qとの相互作用について抗体のFc領域を非活性にするために、いくつかの変異体を構築することができる。そのような変異体の例を本明細書に記載する。

【００９４】

したがって一態様において、抗体は、該抗体が野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように修飾されたFc領域を含み、ここでは該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される。

【００９５】

本明細書において使用する用語「低減する」は、抗体などの対照タンパク質と比較した場合の活性または発現の低減を指す。特に、T細胞増殖に関する場合、「低減する」という用語は、野生型抗体が結合したT細胞の増殖と比較した場合に、T細胞の増殖を低減し、最小限に抑え、または完全に阻害する本発明の抗体の能力を指す。T細胞増殖を低減する抗体の能力は、実施例4および実施例8で述べるように、PBMCに基づく機能アッセイによって評価することができる。一態様では、アッセイがヒトPBMCで行われる。別の態様では、アッセイがカニクイザルPBMCで行われる。さらに別の態様では、アッセイがアカゲザルPBMCで行われる。本発明の抗体は交差反応性であるから、本明細書に記載するPBMCに基づくアッセイは、使用する種のPBMCが抗体の交差反応性スペクトル内である限り、T細胞増殖の低減を示すために、例えばヒト、カニクイザルまたはアカゲザルなど、任意の種のPBMCを使って行うことができる。

【００９６】
本明細書において使用する用語「末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイ」は、本発明の抗体の機能的特徴、例えばT細胞増殖またはCD69発現に影響を及ぼす該抗体の能力を評価するために使用されるアッセイであって、存在する唯一の細胞が末梢血単核球であるアッセイを指す。したがって一態様では、PBMCを1～1000ng/mLの範囲の抗体と共に5％（vol/vol）CO_2湿潤インキュベータ中、37℃で3日間インキュベートする工程、増殖細胞のDNA中に組み込まれるBrdUなどの化学化合物を加える工程、5時間インキュベートする工程、細胞をペレット化する工程、細胞を乾燥する工程、任意で細胞を4℃で保存する工程、細胞をELISAプレートにコーティングする工程、抗BrdU-ペルオキシダーゼと共に室温で90分間インキュベートする工程、1mg/mLの2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）で約30分間発色させる工程、反応を停止するために100μLの2％シュウ酸を加える工程、および適切なマイクロプレートリーダーにおいて405nmの吸光度を測定する工程を含む方法によって、T細胞増殖が測定される。
【００９７】
本明細書において使用する用語「増殖」は、細胞分裂を背景とする細胞成長を指す。
【００９８】
本明細書において使用する用語「BrdU」は、チミジンのホモログである5-ブロモ-2'-デオキシウリジンを指す。BrdUを、限られた期間（例えば4時間）、細胞培養に加えると、それは増殖する細胞のDNA中に組み込まれることになる。細胞を固定した後、組み込まれたBrdUの検出は、抗BrdU-ペルオキシダーゼを用いるELISAにおいて行うことができる。それゆえにBrdU組み込みは増殖の尺度になる。
【００９９】
一態様において、抗体は、野生型抗体と比較した場合に該抗体がFc媒介CD69発現を、少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％または100％低減するように修飾されたFc領域を含み、ここでは該Fc媒介CD69発現が、PBMCに基づく機能アッセイにおいて測定される。
【０１００】
本明細書において使用する用語「低減する」は、抗体などの対照タンパク質と比較した場合の活性または発現の低減を指す。特に、T細胞活性化マーカーCD69の発現レベルに関する場合、「低減する」という用語は、抗体の結合領域がどちらもCD3に結合するとしてT細胞に野生型抗体が結合した場合のCD69の発現レベルと比較して、CD69の発現レベルの低減を指す。CD69の発現を低減する抗体の能力は、実施例3および実施例7で述べるように、PBMCに基づく機能アッセイによって評価することができる。したがって一態様では、PBMCを1～1000ng/mLの範囲の抗体と共に5％（vol/vol）CO_2湿潤インキュベータ中、37℃で16～24時間インキュベートする工程、細胞を洗浄する工程、4℃においてマウス抗ヒトCD28-PE抗体およびマウス抗ヒトCD69-APC抗体で細胞を染色する工程、およびCD28陽性細胞上のCD69発現をフローサイトメトリーで決定する工程を含む方法によって、CD69の発現が測定される。
【０１０１】
本明細書において使用する用語「CD69」は、CD69遺伝子によってコードされるヒト膜貫通C型レクチンタンパク質である分化抗原群69を指す。Tリンパ球およびナチュラルキラー（NK）細胞の活性化は、インビボでもインビトロでも、CD69の発現を誘発する。増殖などの細胞活性化イベントに関与するシグナル伝達受容体としてのCD69機能は、リンパ球、例えばナチュラルキラー細胞や、血小板において、また特異的遺伝子の誘発において、シグナル伝達受容体として機能する。
【０１０２】
本明細書において使用する用語「末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイ」は、本発明の抗体の機能的特徴、例えばT細胞増殖またはCD69発現に影響を及ぼす該抗体の能力を評価するために使用されるアッセイであって、存在する唯一の細胞が末梢血単核球であるアッセイを指す。実施例3、4、5および7で述べるPBMCに基づく機能アッセイは、CD69発

現を評価する場合には、（ｉ）PBMCを抗体と共に5％（vol/vol）CO_2湿潤インキュベータ中、37℃で約16～24時間インキュベートする工程、（ｉｉ）細胞を洗浄する工程、（ｉｉｉ）4℃においてマウス抗ヒトCD28-PE抗体およびマウス抗ヒトCD69-APC抗体で細胞を染色する工程、および（ｉｖ）CD28陽性細胞上のCD69発現をフローサイトメトリーで決定する工程を含む。したがって一態様において、CD69発現は、実施例3、4、5、または7で述べるように決定することができる。

【０１０３】

このように、C1qおよびFcガンマ受容体との相互作用に主要な役割を果たすFc領域中のアミノ酸を修飾することができる。修飾することができるアミノ酸位置の例としては、位置L234、L235およびP331が挙げられる。それらの組み合わせ、例えばL234F/L235E/P331Sは、ヒトCD64、CD32A、CD16およびC1qへの結合の大幅な減少を引き起こすことができる。

【０１０４】

したがって一態様において、L234、L235およびP331に対応する少なくとも1つの位置にあるアミノ酸は、それぞれA、AおよびSであることができる（［1］、［28］）。また、L234Fアミノ酸置換およびL235Eアミノ酸置換は、Fcガンマ受容体およびC1qとの相互作用が阻止されたFc領域をもたらすことができる（［29］～［30］）。したがって一態様において、L234およびL235に対応する位置のアミノ酸は、それぞれFおよびEであることができる。D265Aアミノ酸置換は、全てのFcガンマ受容体への結合を減少させ、ADCCを防止することができる（［31］）。したがって一態様において、D265に対応する位置のアミノ酸はAであることができる。C1qへの結合は、位置D270、K322、P329、およびP331を変異させることによって阻止することができる。これらの位置をD270AまたはK322AまたはP329AまたはP331Aのいずれかに変異させることで、抗体をCDC活性欠損性にすることができる（［32］）。したがって一態様において、D270、K322、P329およびP331に対応する少なくとも1つの位置にあるアミノ酸は、それぞれA、A、A、およびAであることができる。

【０１０５】

Fc領域とFcガンマ受容体およびC1qとの相互作用を最小限に抑えるための代替的アプローチは、抗体のグリコシル化部位の除去によるアプローチである。位置N297を例えばQ、A、およびEに変異させることにより、IgG-Fcガンマ受容体相互作用にとって決定的に重要なグリコシル化部位が除去される。したがって一態様において、N297に対応する位置のアミノ酸は、G、Q、AまたはEであることができる（［33］）。Fc領域とFcガンマ受容体との相互作用を最小限に抑えるための別の代替的アプローチは、以下の変異によって得ることができる：P238A、A327Q、P329AまたはE233P/L234V/L235A/G236del（［31］）。

【０１０６】

あるいは、ヒトIgG2およびIgG4サブクラスでは、C1qおよびFcガンマ受容体との相互作用がもともと損なわれていると考えられるが、Fcγ受容体（Fcガンマ受容体）との相互作用も報告されている（［34］～［35］）。どちらのアイソタイプでも、これらの残存相互作用を阻止して、FcR結合に関連する不必要な副作用の低減をもたらす変異を作ることができる。IgG2の場合、それらにはL234AおよびG237Aが含まれ、IgG4の場合はL235Eが含まれる。したがって一態様において、ヒトIgG2重鎖中のL234およびG237に対応する位置のアミノ酸は、それぞれAおよびAであることができる。一態様において、ヒトIgG4重鎖中のL235に対応する位置のアミノ酸は、Eであることができる。

【０１０７】

IgG2抗体においてFcガンマ受容体およびC1qとの相互作用をさらに最小限に抑えるための他のアプローチとして、［36］および［37］に記載されているものが挙げられる。

【０１０８】

抗体のヒンジ領域も、Fcガンマ受容体および補体との相互作用に関して重要でありうる（［38］-［39］）。したがってヒンジ領域における変異またはヒンジ領域の欠失は抗体のエフェクター機能に影響を及ぼすことができる。

【０１０９】

本明細書において使用する用語「架橋」は、抗体Fc領域への結合を介した、FcR保持細

胞による、ターゲット抗原に結合している抗体Fabアーム（一価または二価）の間接的橋かけを指す。したがって、ターゲット抗原保持細胞上にあるそのターゲット抗原に結合する抗体は、FcRを発現する別の細胞と架橋しうる。

【０１１０】

本明細書において使用する用語「非特異的殺滅」は、T細胞または他のエフェクター細胞の細胞傷害機能による細胞の殺滅であって、該細胞の腫瘍ターゲット抗原非依存的な活性化によるものを指す。したがって非特異的殺滅とは、腫瘍ターゲット保持細胞を、例えばCDCを誘発することなどにより、腫瘍ターゲットに結合する抗体によって殺滅するのではなく、例えば細胞傷害性T細胞によって殺滅しうることを意味する。

【０１１１】

Fc領域中の少なくとも5つの特異的アミノ酸位置の1つまたは複数を修飾することによって、非活性化Fc領域を得ることができることを、本発明者らは示した（実施例3～5、7～10）。

【０１１２】

したがって一態様では、抗体が第1および第2免疫グロブリン重鎖を含み、該第1および第2免疫グロブリン重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置の1つまたは複数のアミノ酸は、それぞれL、L、D、N、およびPではない。

【０１１３】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置の1つまたは複数のアミノ酸が、それぞれL、L、D、N、およびPではない。

【０１１４】

別の態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235およびD265に対応する位置の1つまたは複数のアミノ酸が、それぞれL、LおよびDではなく、ヒトIgG1重鎖中のN297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。

【０１１５】

本明細書において使用する用語「位置～に対応するアミノ酸」とは、ヒトIgG1重鎖中のアミノ酸位置番号を指す。別段の明言がある場合を除き、または文脈上矛盾が生じる場合を除き、定常領域配列のアミノ酸は、本明細書では、Euナンバリングインデックス（［27］に記載）に従ってナンバリングされる。したがって、別の他の配列中のアミノ酸またはセグメント「に対応する」ある配列中のアミノ酸またはセグメントとは、例えばALIGN、ClustalWその他の標準的配列アラインメントプログラムを、典型的にはデフォルト設定で使用した場合に、前記他のアミノ酸またはセグメントと整列し、ヒトIgG1重鎖に対して少なくとも50％、少なくとも80％、少なくとも90％、または少なくとも95％の同一性を有するものである。配列または配列中のセグメントを整列させ、それによって本発明のアミノ酸位置に対応する配列中の位置を決定する方法は、当技術分野において周知であると考えられる。

【０１１６】

本発明においては、アミノ酸を上述のように定義することができる。

【０１１７】

重鎖中のアミノ酸に関して「アミノ酸が～ではない」という用語または類似の表現は、そのアミノ酸が言及された特定アミノ酸を除く他の任意のアミノ酸であることを意味すると理解すべきである。例えば、ヒトIgG1重鎖中のL234に対応する位置のアミノ酸がLではないとは、そのアミノ酸が、L以外の他の天然アミノ酸または非天然アミノ酸のいずれかでありうることを意味する。

【０１１８】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸がDではない。

【０１１９】
一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中のD265に対応する位置のアミノ酸がDではなく、ヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸がそれぞれNおよびPである。
【０１２０】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。
【０１２１】
アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「疎水性」は、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミノ酸の群から選択される。
【０１２２】
アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「極性」は、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒト重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。
【０１２３】
別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸または酸性アミノ酸である。
【０１２４】
アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「脂肪族非荷電」は、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される。
【０１２５】
アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「芳香族」は、F、T、およびWからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、F、T、およびWからなる群より選択される。
【０１２６】
アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「酸性」は、DおよびEからなる群より選ばれる任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、DおよびEからなる群より選択される。
【０１２７】
ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、E、F、G、I、L、T、V、およびWからなる群より選択される。
【０１２８】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、Dではない。
【０１２９】
一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のD265に対応する位置のアミノ酸がDではなく、ヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸がそれぞれNおよびPである。
【０１３０】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

【０１３１】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「疎水性」は、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミノ酸の群から選択される。

【０１３２】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「極性」は、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒト重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミノ酸の群から選択される。

【０１３３】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒト重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。

【０１３４】

別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸または酸性アミノ酸である。

【０１３５】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「脂肪族非荷電」は、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される。

【０１３６】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「芳香族」は、F、T、およびWからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、F、T、およびWからなる群より選択される。

【０１３７】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「酸性」は、DおよびEからなる群より選ばれる任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、DおよびEからなる群より選択される。

【０１３８】

ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、E、F、G、I、L、T、V、およびWからなる群より選択される。

【０１３９】

さらなる態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置N297に対応する位置のアミノ酸が、Nではない。

【０１４０】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中のN297に対応する位置のアミノ酸がNではなく、ヒトIgG1重鎖中の位置P331に対応する位置のアミノ酸がPである。

【０１４１】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置N297に対応する位置のアミノ酸が、Nではない。

【０１４２】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のN297に対応する位置のアミノ酸がNではなく、ヒトIgG1重鎖中の位置P331に対応する位置のアミノ酸がPである。

【０１４３】

さらなる態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれLおよびLではない。

【０１４４】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中のL234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれLおよびLではなく、ヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸がそれぞれNおよびPである。

【０１４５】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応するアミノ酸が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、Y、Vからなる群より選択される。

【０１４６】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

【０１４７】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「疎水性」は、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、F、G、H、I、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

【０１４８】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「極性」は、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなるアミノ酸の群より選択される。

【０１４９】

ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

【０１５０】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれLおよびLではない。

【０１５１】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のL234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれLおよびLではなく、ヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸がそれぞれNおよびPである。

【０１５２】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

【０１５３】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、F、G、H、I、M、R、T、V、W、

およびYからなる群より選択される。

【０１５４】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなるアミノ酸の群より選択される。

【０１５５】

ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

【０１５６】

別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸または酸性アミノ酸である。

【０１５７】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「脂肪族非荷電」は、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、G、I、およびVからなる群より選択される。

【０１５８】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「芳香族」は、F、T、およびWからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、F、T、およびWからなる群より選択される。

【０１５９】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「酸性」は、DおよびEからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、DおよびEからなる群より選択される。

【０１６０】

ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、D、E、F、G、I、T、V、およびWからなる群より選択される。

【０１６１】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、FおよびE、またはAおよびAである。

【０１６２】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中のL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびE、またはAおよびAであり、かつヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、NおよびPである。

【０１６３】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびE、またはAおよびAである。

【０１６４】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびE、またはAおよびAであり、かつヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。

【０１６５】

ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびEである。

【０１６６】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびEである。

【０１６７】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、少なくともヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれAおよびAである。

【０１６８】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、少なくともヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれAおよびAである。

【０１６９】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれL、L、およびDではない。

【０１７０】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれL、LおよびDではなく、ヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。

【０１７１】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応するアミノ酸が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、Y、V、およびWからなる群より選択され、かつ位置D265に対応するアミノ酸が、A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、Y、V、およびWからなる群より選択される。

【０１７２】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235およびD265に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

【０１７３】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「疎水性」は、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミノ酸の群から選択され、かつヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、F、G、H、I、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

【０１７４】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「極性」は、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなるアミノ酸の群より選択され、かつヒト重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。

【０１７５】

ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択され、かつヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S

、T、V、W、およびYからなる群より選択される。
【０１７６】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。
【０１７７】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミノ酸の群から選択され、かつヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、F、G、H、I、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択される。
【０１７８】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなるアミノ酸の群より選択され、かつヒト重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。
【０１７９】
ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択され、かつヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択される。
【０１８０】
別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235およびD265に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸または酸性アミノ酸である。
【０１８１】
アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「脂肪族非荷電」は、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、G、I、L、およびVからなる群より選択され、かつヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、G、I、およびVからなる群より選択される。
【０１８２】
アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「芳香族」は、F、T、およびWからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、F、T、およびWからなる群より選択される。
【０１８３】
アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「酸性」は、DおよびEからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、DおよびEからなる群より選択される。
【０１８４】
ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、E、F、G、I、L、T、V、およびWからなる群より選択され、かつL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、D、E、F、G、I、T、V、およびWからなる群より選択される。
【０１８５】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれL、L、およびDではない。

【０１８６】
一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれL、L、およびDではなく、かつヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。
【０１８７】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸または酸性アミノ酸である。
【０１８８】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、G、I、L、およびVからなる群より選択され、かつヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、G、I、およびVからなる群より選択される。
【０１８９】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、DおよびEからなる群より選択される。
【０１９０】
ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、E、F、G、I、L、T、V、およびWからなる群より選択され、かつL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、D、E、F、G、I、T、V、およびWからなる群より選択される。
【０１９１】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびA、またはA、A、およびAである。
【０１９２】
一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびA、またはA、A、およびAであり、かつヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。
【０１９３】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびA、またはA、A、およびAである。
【０１９４】
一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびA、またはA、A、およびAであり、かつヒトIgG1重鎖中の位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。
【０１９５】
ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。
【０１９６】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。
【０１９７】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれA、A、およびAであ

る。
【０１９８】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれA、A、およびAである。
【０１９９】
別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、Q、およびSである。
【０２００】
一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、Q、およびSである。
【０２０１】
ある特定態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO：8に示すVH配列、SEQ ID NO：10に示すVL配列を含み、かつ重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。
【０２０２】
別の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO：8に示すVH配列、SEQ ID NO：12に示すVL配列を含み、かつ重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。
【０２０３】
別の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO：6に示すVH配列、SEQ ID NO：10に示すVL配列を含み、かつ重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。
【０２０４】
別の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO：6に示すVH配列、SEQ ID NO：12に示すVL配列を含み、かつ重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。
【０２０５】
別の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO：9に示すVH配列、SEQ ID NO：10に示すVL配列を含み、かつ重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。
【０２０６】
別の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO：9に示すVH配列、SEQ ID NO：12に示すVL配列を含み、かつ重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。
【０２０７】
一局面において、本発明は、少なくとも、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による抗体の第1結合領域と、第1結合領域とは異なる1つまたは複数のターゲットに結合する1つまたは複数の結合領域とを含む多重特異性抗体に関する。そのような多重特異性抗体は二重特異性抗体であることができる。
【０２０８】
したがって一局面において、本発明は、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による抗体の第1結合領域と、第1結合領域とは異なるターゲットに結合する第2結合領域とを含む二重特異性抗体に関する。
【０２０９】
「多重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの異なる、例えば少なくとも3つの、典型的にはオーバーラップしていない、エピトープに対する特異性を有する抗体を指す。そのようなエピトープは同じターゲット上にあってもよいし異なるターゲット上にあってもよい。エピトープが異なるターゲット上にある場合、そのようなターゲットは同じ細胞

または細胞タイプ上にあってもよいし異なる細胞または細胞タイプ上にあってもよい。
【０２１０】
「二重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの異なる、典型的にはオーバーラップしていないエピトープに対する特異性を有する抗体を指す。そのようなエピトープは同じターゲット上にあってもよいし異なるターゲット上にあってもよい。エピトープが異なるターゲット上にある場合、そのようなターゲットは同じ細胞または細胞タイプ上にあってもよいし異なる細胞または細胞タイプ上にあってもよい。
【０２１１】
一態様では、二重特異性抗体が第1重鎖および第2重鎖を含む。
【０２１２】
Fc領域の修飾に関係する態様および特異的アミノ酸置換に関係する態様は、本発明の任意の二重特異性抗体の一部であると考えられる。したがって一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方が、本明細書に記載するいずれかの態様において定義するように修飾された1つまたは複数のアミノ酸、例えば不活性Fc領域の提供に関して記載するものを含む。一態様では、該第1重鎖および第2重鎖の両方が、本明細書に記載するいずれかの態様において定義するように修飾された1つまたは複数のアミノ酸、例えば不活性Fc領域の提供に関して記載するものを含む。したがって二重特異性抗体は、本明細書に記載するいずれかの局面または態様にしたがって修飾されたFc領域を含むか、または該第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方が、本明細書に記載するいずれかの局面または態様において定義するように修飾された1つまたは複数のアミノ酸を含む。
【０２１３】
したがって一態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、ここでFc領域は、ELISAによって決定される該抗体へのC1qの結合が、野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％低減するように修飾されている。
【０２１４】
一態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、ここでFc領域は、ELISAによって決定される該抗体へのC1qの結合が、野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％低減するように修飾されている。
【０２１５】
一態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、ここでFc領域は、ELISAによって決定される該抗体へのC1qの結合が、野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％低減するように修飾されている。
【０２１６】
一態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、ここでFc領域は、ELISAによって決定される該抗体へのC1qの結合が、野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％低減するように修飾されている。
【０２１７】
一態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、ここでFc領域は、ELISAによって決定される該抗体へのC1qの結合が、野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％低減するように修飾されている。

【０２１８】
一態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、ここでFc領域は、ELISAによって決定される該抗体へのC1qの結合が、野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％低減するように修飾されている。
【０２１９】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体が野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される。
【０２２０】
一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体が野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される。
【０２２１】
一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体が野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される。
【０２２２】
一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体が野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される。
【０２２３】
一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体が野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される。
【０２２４】
一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体が野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される。
【０２２５】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に

示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体がFc媒介CD69発現を、野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該Fc媒介CD69発現が、PBMCに基づく機能アッセイにおいて決定される。

【０２２６】

一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体がFc媒介CD69発現を、野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該Fc媒介CD69発現が、PBMCに基づく機能アッセイにおいて決定される。

【０２２７】

一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体がFc媒介CD69発現を、野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該Fc媒介CD69発現が、PBMCに基づく機能アッセイにおいて決定される。

【０２２８】

一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体がFc媒介CD69発現を、野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該Fc媒介CD69発現が、PBMCに基づく機能アッセイにおいて決定される。

【０２２９】

一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体がFc媒介CD69発現を、野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該Fc媒介CD69発現が、PBMCに基づく機能アッセイにおいて決定される。

【０２３０】

一つの態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ、該抗体がFc媒介CD69発現を、野生型抗体と比較して少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減するように、Fc領域が修飾されており、ここでは該Fc媒介CD69発現が、PBMCに基づく機能アッセイにおいて決定される。

【０２３１】

ある特定態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。

【０２３２】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。

【０２３３】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。

【０２３４】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。

【０２３５】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。

【０２３６】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列を含む第1結合領域を含み、かつ第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。

【０２３７】

本発明において使用することができる二重特異性抗体分子の例には、（i）異なる抗原結合領域を含む2つのアームを有する単一抗体、（ii）例えば追加ペプチドリンカーによってタンデムに連結された2つのscFvにより、2つの異なるエピトープに対する特異性を有する一本鎖抗体、（iii）各軽鎖および重鎖が2つの可変ドメインを短いペプチド結合によってタンデムに含有している二重可変ドメイン抗体（dual-variable domain antibody（DVD-Ig（商標））（［40］）、（iv）化学的に連結された二重特異性（Fab'）2フラグメント、（v）ターゲット抗原のそれぞれに対して2つの結合部位を有する四価の二重特異性抗体をもたらす2つの一本鎖ダイアボディ（diabody）の融合物である、TandAb（登録商標）、（vi）多価分子をもたらすscFvとダイアボディとの組み合わせである、フレキシボディ（flexibody）、（vii）プロテインキナーゼA中の「二量体化およびドッキングドメイン」に基づくいわゆる「ドック・アンド・ロック（dock and lock）」分子（Dock-and-Lock（登録商標））、Fabに応用した場合、これは、異なるFabフラグメントに連結された2つの同一Fabフラグメントからなる三価二重特異性結合タンパク質を与えることができる、（viii）例えばヒトFabアームの両端に融合された2つのscFvを含む、いわゆるスコーピオン（Scorpion）分子、および（ix）ダイアボディが含まれる。

【０２３８】

一態様では、本発明の二重特異性抗体がダイアボディ、クロスボディ（cross-body）、または制御されたFabアーム交換（controlled Fab arm exchange）によって得られる二重特異性抗体、例えば本発明において記載するもののようなDuoBody（登録商標）（例えば［41］に記載されているもの）である。

【０２３９】

異なる種類の二重特異性抗体の例としては、（i）ヘテロ二量体化を強いるための相補的CH3ドメインを有するIgG様分子、（ii）分子の両面がそれぞれ少なくとも2つの異なる抗体のFabフラグメントまたはFabフラグメントの一部を含有している、組換えIgG様二重ターゲティング分子、（iii）全長IgG抗体が追加のFabフラグメントまたはFabフラグメントの一部に融合されているIgG融合分子、（iv）一本鎖Fv分子または安定化ダイアボディが重鎖定常ドメイン、Fc領域またはその一部に融合されているFc融合分子、（v）異なるFabフラグメントが一つに融合されるか、重鎖定常ドメイン、Fc領域またはその一部に融合されている、Fab融合分子、および（vi）異なる一本鎖Fv分子、または異なるダイアボディもしくは異なる重鎖抗体（例えばドメイン抗体、Nanobodies（登録商標））が互いに融合しているか、重鎖定常ドメイン、Fc領域またはその一部に融合された別のタンパク質または担体分子に融合している、ScFvおよびダイアボディに基づく抗体ならびに重鎖抗体（例えばドメイン抗体、Nanobodies（登録商標））が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【０２４０】

相補的CH3ドメイン分子を有するIgG様分子の例としては、Triomab（登録商標）（Trion Pharma/Fresenius Biotech, [42]）、ノブ・イントゥ・ホール（Knobs-into-Holes）（Genentech, [43]）、CrossMAb（Roche, [44]）および静電マッチ（electrostatically-matched）（Amgen, [45]～[46];Chugai, [47];Oncomed, [48]）、LUZ-Y（Genentech）、DIG-ボディおよびPIG-ボディ（Pharmabcine）、ストランド・エクスチェンジ・エンジニアード・ドメイン（Strand Exchange Engineered Domain）ボディ（SEEDbody）（EMD Serono, [49]）、Biclonic（Merus）、FcΔAdp（Regeneron, [50]）、二重特異性IgG1およびIgG2（Pfizer/Rinat, [51]）、Azymetricスキャフォールド（Zymeworks/Merck, [52]）、mAb-Fv（Xencor, [53]）、二価二重特異性抗体（Roche）およびDuoBody（登録商標）分子（Genmab A/S, [41]）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０２４１】

組換えIgG様二重ターゲティング分子の例としては、デュアル・ターゲティング（Dual Targeting）（DT）-Ig（GSK/Domantis）、ツー・イン・ワン（Two-in-one）抗体（Genentech）、架橋（Cross-linked）Mab（Karmanos Cancer Center）、mAb2（F-Star, [54]）、Zybodies（商標）（Zyngenia）、共通軽鎖（common light chain）によるアプローチ（Crucell/Merus, [55]）、κλBody（NovImmune）およびCovX-body（登録商標）（CovX/Pfizer）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０２４２】

IgG融合分子の例としては、Dual Variable Domain（DVD）-Ig（商標）（Abbott, [56]）、デュアルドメイン・ダブルヘッド（Dual domain double head）抗体（Unilever;Sanofi Aventis, [57]）、IgG様二重特異性（ImClone/Eli Lilly）、Ts2Ab（MedImmune/AZ）およびBsAb（Zymogenetics）、ハーキュリーズ（HERCULES）（Biogen Idec, [58]）、scFv融合物（Novartis）、scFv融合物（Changzhou Adam Biotech Inc., [59]）およびTvAb（Roche, [59], [60]）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０２４３】

Fc融合分子の例としては、ScFv/Fc融合物（Academic Institution）、スコーピオン（SCORPION）（Emergent BioSolutions/Trubion、Zymogenetics/BMS）、デュアル・アフィニティー・リターゲティング・テクノロジー（Dual Affinity Retargeting Technology）（Fc-DART（商標））（MacroGenics, [62], [63]）およびDual（ScFv）2-Fab（National Research Center for Antibody Medicine-China）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０２４４】

Fab融合二重特異性抗体の例としては、F（ab）2（Medarex/AMGEN）、デュアル-アクション（Dual-Action）またはBis-Fab（Genentech）、Dock-and-Lock（登録商標）（DNL）（ImmunoMedics）、二価二重特異性（Bivalent Bispecific）（Biotecnol）およびFab-Fv（UCB-Celltech）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０２４５】

ScFvに基づく抗体、ダイアボディに基づく抗体およびドメイン抗体の例としては、二重特異性T細胞エンゲイジャー（Bispecific T cell Engager）（BiTE（登録商標））（Micromet）、タンデム・ダイアボディ（Tandem Diabody）（Tandab）（Affimed）、デュアル・アフィニティー・リターゲティング・テクノロジー（Dual Affinity Retargeting Technology）（DART（商標））（MacroGenics）、一本鎖ダイアボディ（Single-chain Diabody）（Academic）、TCR様抗体（AIT、ReceptorLogics）、ヒト血清アルブミンScFv融合物（Merrimack）およびCOMBODY（Epigen Biotech）、二重ターゲティング（dual targeting）ナノボディ（nanobodies（登録商標））（Ablynx）、二重ターゲティング重鎖単独ドメイン抗体（dual targeting heavy chain only domain antibody）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０２４６】

さらに、本明細書に記載するアッセイ条件を満たす単一特異性抗体はいずれも二重特異性抗体の基礎を形成しうると考えられる。すなわち、結合領域の一つがCD3に結合する二

重特異性抗体は、機能アッセイで試験され本明細書に明言する要件を満たす任意の単一特異性CD3抗体に由来しうる。そのような二重特異性抗体は、参照により本明細書に組み入れられる［41］に記載の方法によって得ることができる。

【０２４７】

したがって、ある特定態様では、前記第1重鎖および第2重鎖のそれぞれが、少なくともヒンジ領域、CH2およびCH3領域を含み、該第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも1つが置換されており、かつ該第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも1つが置換されており、しかも該第1重鎖と該第2重鎖とは同じ位置では置換されていない。この文脈において「置換されている」という用語は、特定アミノ酸位置のアミノ酸が別の天然または非天然アミノ酸で置換されていることを指す。したがって、ヒトIgG1重鎖中の位置に対応する位置の「置換」アミノ酸とは、その特定位置にあるアミノ酸が、IgG1重鎖中の天然のアミノ酸とは異なることを意味する。

【０２４８】

一態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がKでもLでもMでもなく、任意で、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がFであり、かつ前記第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、F405、およびY407からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも1つが置換されている。

【０２４９】

一態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がKでもLでもMでもなく、かつ前記第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がFではなく、任意で、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がKである。

【０２５０】

一態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がFでもRでもGでもなく、前記第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸が置換されている。

【０２５１】

一態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がKでもLでもMでもなく、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がFではない。

【０２５２】

さらに別の態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ前記第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRであるか、またはその逆である。

【０２５３】

したがって一態様では、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

【０２５４】

さらに別の態様では、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体が、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方に、上記態様のいずれか一つに開示する不活性化置換、例えばL234F、L235E、およびD265Aの1つまたは複数を含有し、かつ、F405に対応する位置のアミノ酸がFではない。一態様では、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体が、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方に、上記態様のいずれか一つに開示する不活性化置換、例えばL234F、L235E、およびD265Aの1つまたは複数と、K409位のさらに別の置換、例えばK409Rとを含有する。特に、一態様では、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体が、第1重鎖と第2重鎖の両方に、上記態様のいずれか一つに開示する不活性化置換、例えばL234F、L235E、および

D265Aの1つまたは複数と、F405位の置換、例えばF405Lとを含有する。一態様では、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体が、第1重鎖と第2重鎖の両方に、上記態様のいずれか一つに開示する不活性化置換、例えばL234F、L235E、およびD265Aの1つまたは複数と、K409位のさらに別の置換、例えばK409Rとを含有する。そのような抗体は二重特異性抗体を作製するために役立つ。

【０２５５】

したがって、さらに別の態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれF、E、およびAであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２５６】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、N、およびPであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２５７】

ある代替態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

【０２５８】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、N、およびPであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

【０２５９】

別の態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２６０】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、N、およびPであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２６１】

ある代替態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

【０２６２】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中のL234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、N、およびPであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

【０２６３】

本明細書で述べるように、がん細胞または腫瘍細胞などの特異的ターゲット細胞へのT

細胞動員は、ターゲット細胞を殺滅する方法になる。本発明者らは、両方の重鎖に特異的アミノ酸置換L234F、L235E、およびD265Aを含む二重特異性CD3×HER2抗体が、実施例5で述べるように、AU565細胞の殺滅を誘発できることを示した。T細胞が媒介する殺滅は、第1結合領域でCD3を標的としかつ第2結合領域で別のターゲットを標的とする二重特異性抗体によって得ることができる。したがって一態様では、第1結合領域がヒト化またはキメラCD3抗体に関して本明細書に記載するいずれかの態様に従い、第2結合領域は第1結合領域とは異なるターゲットに結合する。抗体が二重特異性抗体である場合、抗体の少なくとも半分、すなわち抗体の重鎖と軽鎖の対の一つは、本明細書に記載するヒト化またはキメラ抗体であることを理解すべきである。したがって、二重特異性抗体の半分は、CD3に結合する本発明のヒト化またはキメラ抗体であり、他方の半分は、第2のターゲットに結合するヒト化体、キメラ体、完全非ヒト体または完全ヒト体でありうる。したがって一態様では、抗体が、第1重鎖および第2重鎖、第1軽鎖および第2軽鎖を含み、該第1重鎖および該第1軽鎖はヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、かつ該第2重鎖および第2軽鎖は完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、該第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、かつ該第2結合領域は異なるターゲットに結合する。一態様では、抗体が、第1重鎖および第2重鎖、第1軽鎖および第2軽鎖を含み、該第1重鎖および該第1軽鎖はヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、かつ該第2重鎖および第2軽鎖はヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、該第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、かつ該第2結合領域は該第1結合領域とは異なるCD3エピトープに結合する。

【０２６４】

したがって一態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２６５】

一態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２６６】

別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２６７】

別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第

2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２６８】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２６９】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２７０】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２７１】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：8に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２７２】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２７３】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２７４】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２７５】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２７６】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２７７】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２７８】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２７９】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：6に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２８０】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２８１】
別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。
【０２８２】

別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２８３】

別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２８４】

別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２８５】

別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２８６】

別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：19に示すVH配列とSEQ ID NO：20に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２８７】

別の態様では、二重特異性抗体が、SEQ ID NO：9に示すVH配列とSEQ ID NO：12に示すVL配列とを含む第1結合領域、SEQ ID NO：29に示すVH配列とSEQ ID NO：30に示すVL配列とを含む第2結合領域を含み、第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置F405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖中の位置K409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【０２８８】

本明細書において使用する用語「ジスルフィド架橋」は、2つのシステイン残基の間の共有結合を指す。すなわちこの相互作用はCys-Cys相互作用と呼ぶこともできる。

【０２８９】

本明細書において使用する用語「ターゲット」は、本発明の抗体の結合領域が結合する分子を指す。抗体の結合に関連して使用する場合、この用語は、生成させた抗体が指向する任意の抗原を包含する。

【０２９０】

一特定態様では、第1重鎖および第1軽鎖がヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフ

ィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、第2重鎖および第2軽鎖が完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、第2結合領域は異なるターゲットに結合し、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

【０２９１】

一特定態様では、第1重鎖および第1軽鎖がヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、第2重鎖および第2軽鎖が完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、第2結合領域は第1結合領域とは異なるCD3エピトープに結合し、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

【０２９２】

一特定態様では、第1重鎖および第1軽鎖がヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、第2重鎖および第2軽鎖が完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、第2結合領域は異なるターゲットに結合し、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

【０２９３】

一特定態様では、第1重鎖および第1軽鎖がヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、第2重鎖および第2軽鎖が完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、第2結合領域は第1結合領域とは異なるCD3エピトープに結合し、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

【０２９４】

核酸コンストラクト、発現ベクター、および宿主細胞

一局面において、本発明は、表1に示す1つまたは複数の配列をコードする核酸コンストラクトに関する。したがって本発明は、SEQ ID NO：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、および26に示す配列のいずれか一つをコードする核酸コンストラクトに関する。

【０２９５】

さらに別の局面において、本発明は、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体の配列をコードする核酸コンストラクト、本発明の核酸コンストラクトを含む発現ベクター、前記発現ベクターを含む宿主細胞、および適当な条件下で前記宿主細胞を培養することによって抗体を生産する方法であって、それにより、抗体が生産され、任意で回収される方法に関する。ヒト化CD3抗体は「huCD3」と表すこともできる。

【０２９６】

一態様において、本発明は、（i）本発明のヒト化またはキメラ抗体の重鎖配列をコードする核酸配列、（ii）本発明のヒト化またはキメラ抗体の軽鎖配列をコードする核酸配列、または（iii）（i）と（ii）の両方を含む発現ベクターを提供する。したがって、発現ベクターは、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による1つまたは複数の核酸コンストラクトまたは核酸配列を含む。

【０２９７】

一態様において、本発明の発現ベクターは、SEQ ID NO：1、2、3、4、および5、ならびに配列GTNからなる群より選択される重鎖および軽鎖CDR配列の1つまたは複数をコードす

る核酸配列を含む。

【０２９８】

一態様において、本発明は、SEQ ID NO：6、7、8、9、10、11、12、19、20、27、28、29、および30、またはそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される1つまたは複数のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターを提供する。別の態様では、発現ベクターが、SEQ ID NO：3に示すVH CDR3アミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。別の態様では、発現ベクターが、SEQ ID NO：6、7、8、9、19、27、および29から選択されるVHアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。別の態様では、発現ベクターが、SEQ ID NO：10、11、12、20、28、および30から選択されるVLアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。別の態様では、発現ベクターが、ヒト抗体軽鎖、ヒト抗体重鎖、またはその両方の定常領域をコードする核酸配列を含む。別の態様において、本発明は、SEQ ID NO：15、16、23、24、25、および26のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む発現ベクターを提供する。

【０２９９】

ある特定態様では、発現ベクターが、上記アミノ酸配列の1つまたは複数の変異体をコードする核酸配列を含み、該変異体は、最大で25個のアミノ酸修飾、例えば最大で20個、例えば最大で15、14、13、12、または11個のアミノ酸修飾、例えば10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個のアミノ酸修飾、例えば欠失または挿入、好ましくは置換、例えば保存的置換または非保存的置換を有するか、または該配列のいずれかに対して少なくとも80％の同一性、例えば少なくとも85％の同一性または90％の同一性または95％の同一性、例えば前述のアミノ酸配列のいずれかに対して96％の同一性または97％の同一性または98％の同一性または99％の同一性を有する。本発明は、上述の核酸配列とは異なるが、遺伝コードの多様性ゆえに、本発明の抗体と同じアミノ酸配列をコードする核酸配列にも関係する。例えば、核酸配列が変化しても本明細書に記載するいずれかのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をもたらしうる。遺伝コードに基づいてそのようなさらなる核酸配列を同定する方法は、当業者には周知である。

【０３００】

さらに別の態様では、発現ベクターが、抗体、例えばヒト抗体の、軽鎖、重鎖または軽鎖と重鎖の両方の定常領域をコードする核酸配列をさらに含む。

【０３０１】

上述のような発現ベクターは、本発明の抗体の組換え生産に使用することができる。

【０３０２】

本発明に関して発現ベクターは、染色体ベクター、非染色体ベクター、および合成核酸ベクター（発現制御要素の適切なセットを含む核酸配列）など、任意の適切なベクターであることができる。そのようなベクターの例として、SV40の誘導体、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージDNAとの組合せから誘導されるベクター、およびウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターが挙げられる。一態様では、ヒト化またはキメラCD3抗体をコードする核酸が、裸のDNAまたはRNAベクター、例えば線状発現要素（例えば［64］に記載されているもの）、圧縮された核酸ベクター（例えば［65］および/または［66］に記載されているもの）、pBR322、pUC19/18、またはpUC118/119などのプラスミドベクター、「midge」最小サイズ核酸ベクター（例えば［67］に記載されているもの）、または$CaP0_4$沈降コンストラクトなどの沈降核酸ベクターコンストラクト（例えば［68］、［69］、［70］、および［71］に記載されているもの）に含まれる。そのような核酸ベクターとその使用法は当技術分野において周知である（例えば［72］および［73］を参照されたい）。

【０３０３】

一態様では、ベクターが、細菌細胞におけるヒト化またはキメラCD3抗体の発現に適している。そのようなベクターの例として、例えばBlueScript（Stratagene）、pINベクター（［74］）、pETベクター（Novagen、ウィスコンシン州マディソン）などの発現ベクターが挙げられる。

【０３０４】
これに加えてまたはこれに代えて、発現ベクターは酵母系における発現に適したベクターであってもよい。酵母系における発現に適した任意のベクターを使用することができる。適切なベクターとしては、例えばアルファ因子、アルコールオキシダーゼおよびPGHなどの、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターが挙げられる（［75］および［76］に総説がある）。
【０３０５】
核酸コンストラクトおよび/またはベクターは、新生ポリペプチド鎖などのポリペプチドを細胞周辺腔にまたは細胞培養培地中にターゲティングすることができる分泌配列/局在化配列をコードする核酸配列も含みうる。そのような配列は当技術分野において公知であり、これには、当技術分野において周知の分泌リーダーまたはシグナルペプチド、細胞小器官ターゲティング配列（例えば核局在化配列、ER保持シグナル、ミトコンドリア輸送配列、クロロプラスト輸送配列）、膜局在化/アンカー配列（例えば膜透過停止配列、GPIアンカー配列）などが含まれる。
【０３０６】
本発明の発現ベクターでは、ヒト化またはキメラCD3抗体をコードする配列が、任意の適切なプロモーター、エンハンサー、および他の発現促進要素を含むか、またはそれらと関連しうる。そのような要素の例としては、強力な発現プロモーター（例えばヒトCMV IEプロモーター/エンハンサー、ならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモーター）、効果的なポリ（A）終結配列、大腸菌におけるプラスミド生産のための複製起点、選択可能マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子、および/または好都合なクローニング部位（例えばポリリンカー）が挙げられる。核酸コンストラクトおよび/またはベクターは、構成的プロモーターではなく、CMV IEなどの誘導性プロモーターも含みうる（これらの用語が一定の条件下での遺伝子発現の程度の記述語であることは、当業者にはわかるであろう）。
【０３０７】
一態様では、ヒト化またはキメラCD3抗体をコードする発現ベクターを、ウイルスベクターによって宿主細胞または宿主動物に配置し、かつ/または送達することができる。
【０３０８】
そのような発現ベクターは、ヒト化またはキメラCD3抗体の組換え生産のために試用することができる。
【０３０９】
一局面において、本発明は、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。
【０３１０】
一局面において、本明細書に記載するいずれかの局面または態様のヒト化またはキメラCD3抗体は、抗体を生産する組換え真核宿主細胞、組換え原核宿主細胞、または組換え微生物宿主細胞を利用して提供される。したがって本発明は、本明細書に定義するヒト化またはキメラCD3抗体または免疫グロブリンを生産する組換え真核宿主細胞、組換え原核宿主細胞、または組換え微生物宿主細胞を提供する。宿主細胞の例としては、酵母、細菌細胞および哺乳動物細胞、例えばCHOまたはHEK-293細胞が挙げられる。例えば一態様では、宿主細胞が、本明細書に記載するヒト化またはキメラCD3抗体の発現をコードする配列を含む細胞ゲノムに安定に組み込まれた核酸配列を含む。別の態様では、宿主細胞が、本明細書に記載のヒト化またはキメラCD3抗体の発現をコードする配列を含む非組込み型の核酸配列、例えばプラスミド、コスミド、ファージミド、または線状発現要素を含む。
【０３１１】
本明細書において使用する用語「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）は、発現ベクターまたは核酸コンストラクトもしくは核酸配列が導入されている細胞を指すものとする。このような用語は、その特定対象細胞を指すだけでなく、そのような細胞の子孫も指すものとすることを理解すべきである。世代を重ねるにつれて変異または環境の影響のいずれかによって一定の修飾が起こりうるので、そのような子孫は、実際には親細胞と

同一ではないかもしれないが、それでも本明細書において使用する用語「宿主細胞」の範囲内に包含される。組換え宿主細胞としては、例えば、CHO細胞、HEK-293細胞、PER.C6、NS0細胞、およびリンパ球細胞などの真核宿主細胞、大腸菌などの原核細胞、ならびに植物細胞および真菌などの他の真核宿主が挙げられる。

【０３１２】

さらに別の局面において、本発明は、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体を生産するための方法であって、

a）上述した本発明の宿主細胞を培養する工程、および

b）本発明の抗体を培養培地から回収しかつ/または精製する工程

を含む方法に関する。

【０３１３】

さらに別の局面では、ヒト化またはキメラCD3抗体の配列をコードするヌクレオチド配列が、治療用ポリペプチドなどの第2の部分をコードする。例示的な治療用ポリペプチドは本明細書の他の項に記載する。一態様において、本発明は、ヒト化またはキメラCD3抗体融合タンパク質を生産するための方法であって、

a）そのようなヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞を培養する工程、および

b）ヒト化またはキメラCD3抗体融合タンパク質を培養培地から回収しかつ/または精製する工程

を含む方法に関する。

【０３１４】

組成物

一局面において、本発明は、本明細書に記載するいずれかの局面および態様による抗体または二重特異性抗体を含む組成物を提供する。

【０３１５】

一局面において、本発明は、本明細書に記載するいずれか一つの局面および態様に定義する抗体または二重特異性抗体と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。

【０３１６】

薬学的組成物は、従来の技法、例えば［77］に開示されている技法に従って、薬学的に許容される担体または希釈剤ならびに他の任意の公知の佐剤および賦形剤を使って製剤化することができる。

【０３１７】

薬学的に許容される担体または希釈剤ならびに他の任意の公知の佐剤および賦形剤は、本発明のヒト化またはキメラ抗体および選ばれた投与様式に適しているべきである。薬学的組成物の担体および他の構成要素の適性は、抗原結合に関して、選ばれた本発明の化合物または薬学的組成物の所望の生物学的性質に対する有意な負の影響の欠如（例えば有意でない影響（10％以下の相対的阻害、5％以下の相対的阻害など））に基づいて決定される。

【０３１８】

本発明の薬学的組成物は、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、洗浄剤（例えば非イオン性洗浄剤、例えばTween-20またはTween-80）、安定剤（例えば糖またはタンパク質フリーアミノ酸）、保存剤、組織固定剤、可溶化剤、および/または薬学的組成物に含めるのに適した他の材料も含みうる。

【０３１９】

本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、患者に対する毒性を伴うことなく、特定の患者、組成物、および投与様式について所望の治療応答を達成するのに有効な活性成分量が得られるように、変化させることができる。選択される投薬量レベルは、種々の薬物動態因子、例えば使用される本発明の特定組成物またはそのアミドの活性、投与経路、投与時間、使用されている特定化合物の排出速度、処置の継続時間、使用さ

れる特定組成物と併用される他の薬物、化合物および/または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康状態、および既往歴、その他、医学分野において周知の因子に依存するであろう。

【０３２０】

薬学的組成物は、任意の適切な経路および様式で投与することができる。インビボおよびインビトロで本発明のヒト化またはキメラ抗体を投与する適切な経路は当技術分野において周知であり、当業者であれば選択することができる。

【０３２１】

一態様では、本発明の薬学的組成物が非経口投与される。

【０３２２】

本明細書において使用する表現「非経口投与」および「非経口投与される」は、経腸投与および外用投与以外の、通常は注射による投与様式を意味し、これには、表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外および胸骨内注射および注入が含まれる。

【０３２３】

一態様では、上記薬学的組成物が静脈内または皮下注射または注入によって投与される。

【０３２４】

薬学的に許容される担体には、本発明のヒト化またはキメラ抗体と生理学的に適合する、ありとあらゆる適切な溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張剤、酸化防止剤および吸収遅延剤などが含まれる。

【０３２５】

本発明の薬学的組成物に使用することができる適切な水性および非水性の担体の例として、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物、植物油、例えばオリーブ油、トウモロコシ油、ラッカセイ油、綿実油、およびゴマ油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよび注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチル、および/またはさまざまな緩衝液が挙げられる。他の担体は薬学分野では周知である。

【０３２６】

薬学的に許容される担体としては、滅菌水性溶液または分散液および滅菌注射可能溶液または分散液をその場で調製するための滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。従来の媒質または薬剤は、それらが活性化合物と不適合でない限り、本発明の薬学的組成物におけるその使用が考えられる。「活性化合物」という場合、それは、本発明のヒト化またはキメラ抗体も指すと考えられる。

【０３２７】

適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用によって、分散系の場合は必要な粒度を維持することによって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。

【０３２８】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される酸化防止剤、例えば（1）水溶性酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、システイン塩酸塩、亜硫酸水素ナトリウム、メタ亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど、（2）油溶性酸化防止剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロールなど、および（3）金属キレート物質、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸なども含みうる。

【０３２９】

本発明の薬学的組成物は、等張剤、例えば糖類、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、グリセロール、または塩化ナトリウムも、組成物中に含みうる。

【０３３０】

本発明の薬学的組成物は、選んだ投与経路に適した1つまたは複数の佐剤、例えば薬学的組成物の貯蔵寿命または有効性を強化しうる保存剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、保存剤または緩衝剤も含有しうる。本発明のヒト化またはキメラ抗体は、例えばインプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む放出制御製剤など、化合物を迅速な放出から保護する担体を使って調製することができる。そのような担体は、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル、生分解性生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を単独で、もしくはワックスと共に、または当技術分野において周知の他の材料を含みうる。そのような製剤を調製するための方法は一般に当業者には公知である（例えば［78］参照）。

【０３３１】

一態様において、本発明のヒト化またはキメラ抗体は、インビボでの適正な分布が保証されるように製剤化することができる。非経口投与用の薬学的に許容される担体としては、滅菌水性溶液または分散液および滅菌注射可能溶液または分散液をその場で調製するための滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。従来の媒質または薬剤は、それらが活性化合物と不適合でない限り、本発明の薬学的組成物におけるその使用が考えられる。他の活性化合物または治療用化合物も組成物に組み込むことができる。

【０３３２】

注射用の薬学的組成物は,典型的には、滅菌状態にあり、かつ製造条件下および貯蔵条件下で安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルション、リポソーム、または高い薬物濃度に適した他の秩序構造として製剤化することができる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物、植物油、例えばオリーブ油、および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルを含有する、水性または非水性の溶媒または分散媒であることができる。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用によって、分散系の場合は必要な粒度を維持することによって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖類、ポリアルコール、例えばグリセロール、マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の長時間吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に含めることによって、生じさせることができる。滅菌注射可能溶液は、必要量の活性化合物を適当な溶媒に必要に応じて上に列挙したような成分の1つまたは組み合わせと共に組み込み、次に滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。一般に、分散液は、基礎分散媒と必要な他の成分、例えば上に列挙したものからの成分とを含有する滅菌媒体に、活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液を調製するための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、活性成分と所望する任意の追加成分との粉末を前もって滅菌ろ過したその溶液から与える真空乾燥および冷凍乾燥（凍結乾燥）である。

【０３３３】

滅菌注射可能溶液は、必要な量の活性成分を必要に応じて上に列挙した成分の1つまたは組み合わせと共に適当な溶媒に組み込み、次に滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。一般に、分散液は、基礎分散媒と必要な他の成分、例えば上に列挙したものからの成分とを含有する滅菌媒体に、活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液を調製するための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、活性成分と所望する任意の追加成分との粉末を前もって滅菌ろ過したその溶液から与える真空乾燥および冷凍乾燥（凍結乾燥）である。

【０３３４】

治療的応用

別の局面において、本発明は、医薬として使用するための、本明細書に記載するいずれかの局面または態様に定義した本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物に関する。

【０３３５】

別の局面において、本発明は、疾患の処置に使用するための、本明細書に記載するいずれかの局面または態様に定義した本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物に関する。

【０３３６】

本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物は、細胞傷害性T細胞のエフェクター機序が望ましい任意のがんの処置に使用することができる。例えばヒト化またはキメラ抗体は、がん、炎症性障害または自己免疫障害などの障害を処置しまたは防止するために、インビトロまたはエクスビボで培養細胞に投与するか、例えばインビボでヒト対象に投与することができる。本明細書において使用する用語「対象」は、典型的には、ヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物に応答するヒトである。対象としては、例えば、ターゲット機能を調整するか直接的または間接的に細胞の殺滅につながることによって矯正しまたは改善させることができる障害を有するヒト患者を挙げることができる。

【０３３７】

別の局面において、本発明は、T細胞の動員が処置または防止に寄与するがんなどの障害を処置しまたは防止するための方法であって、治療有効量の本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む方法を提供する。この方法では、典型的には、障害を処置しまたは防止するのに有効な量のヒト化またはキメラ抗体を対象に投与する。

【０３３８】

一特定局面では、本発明は、本明細書に記載のいずれかの局面および態様に定義する本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、がんの処置方法に関する。

【０３３９】

別の局面において、本発明は、本明細書に記載のいずれかの局面または態様に定義する使用または方法であって、ヒト化またはキメラ抗体が、CD3と、がん特異的ターゲット、またはがんにおいて過剰発現するか、がんに関連するターゲット、例えばHER2、CD19、EpCAM、EGFR、CD66e（またはCEA、CEACAM5）、CD33、EphA2またはMCSP（またはHMW-MAA）との両方に特異的に結合する二重特異性抗体であり、疾患が、がん、例えば乳がん、前立腺がん、非小細胞肺がん、膀胱がん、卵巣がん、胃がん、直腸結腸がん、食道がん、および頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸がん、膵がん、精巣がん、悪性黒色腫、軟組織がん（例えば滑膜肉腫）、低悪性度型または高悪性度型のB細胞性リンパ腫、慢性リンパ性白血病または急性リンパ性白血病である方法に関する。

【０３４０】

ヒト化またはキメラ抗体の有効な投薬量および投薬レジメンは、処置される疾患または状態に依存し、当業者であれば決定することができる。

【０３４１】

当技術分野において通常の知識を有する医師は、必要な薬学的組成物の有効量を容易に決定し処方することができる。例えば医師は、薬学的組成物に入れて使用されるヒト化またはキメラ抗体の用量を、所望の治療効果を達成するのに必要な用量より低いレベルから開始し、所望の効果が達成されるまで投薬量を漸増させることができる。一般に、本発明の組成物の適切な用量は、特定投薬レジメンで治療効果を生じるのに効果的な最小用量であるヒト化またはキメラ抗体の量である。そのような有効用量は、一般に、上述の因子に依存するであろう。

【０３４２】

例えば、治療的使用に関する「有効量」は、疾患の進行を安定化するその能力によって

測定することができる。がんを阻害する化合物の能力は、例えば、ヒト腫瘍における効力を予測する動物モデル系で評価することができる。あるいは、組成物のこの性質は、ヒト化またはキメラ抗体が持つ細胞成長を阻害する能力または細胞傷害性を誘発する能力を、当業者に公知のインビトロアッセイで調べることによって評価することもできる。治療有効量の治療用化合物、すなわち本発明の治療用ヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物は、腫瘍サイズを減少させるか、または他の形で対象における症状を改善することができる。当業者は、対象のサイズ、対象の症状の重症度、および選択した特定組成物または投与経路などといった因子に基づいて、そのような量を決定することができるであろう。

【０３４３】

本発明のヒト化またはキメラ抗体の治療有効量の例示的な非限定的範囲は、約0.001～30mg/kg、例えば約0.001～20mg/kg、例えば約0.001～10mg/kg、例えば約0.001～5mg/kg、例えば約0.001～2mg/kg、例えば約0.001～1mg/kg、例えば約0.001、約0.01、約0.1、約1、約5、約8、約10、約12、約15、約18mg/kgである。

【０３４４】

投与は、例えば静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下投与、例えばターゲット部位の近傍への投与であることができる。

【０３４５】

上記の処置方法および使用における投薬レジメンは、最適な所望の応答（例えば治療応答）を与えるように調節される。例えば、単回ボーラスを投与するか、時間をかけて数回の分割投与を行うか、治療状況の要求に応じて用量を比例的に低減または増加させることができる。

【０３４６】

一態様では、治療中に、例えば所定の時点において、処置の効力をモニタリングする。

【０３４７】

所望であれば、薬学的組成物の有効1日用量を、1日のうちに適当な間隔で、任意で単位剤形で、個別に投与される2、3、4、5、6またはそれ以上の部分用量に分けて投与してもよい。別の態様では、望ましくない副作用をいずれも最小限に抑えるために、ヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物が、長時間、例えば24時間以上にわたる、緩慢な持続注入によって投与される。

【０３４８】

本発明のヒト化またはキメラ抗体を単独で投与することは可能であるが、ヒト化またはキメラ抗体は上述のような薬学的組成物として投与することが好ましい。

【０３４９】

本発明のヒト化またはキメラ抗体の有効用量は、週に1回、2週間に1回または3週間に1回の投与期間を使って投与することもできる。投与期間は、例えば8週間、12週間、または臨床的進行が確立するまでに制限することができる。あるいは、本発明のヒト化またはキメラ抗体の有効用量を、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごとに投与することもできる。

【０３５０】

一態様では、ヒト化またはキメラ抗体を、mg/m^2で計算される1週間量で、注入によって投与することができる。そのような投薬量は、例えば、次式に従い、上記のmg/kg投薬量に基づくことができる：用量（mg/kg）×70：1.8。そのような投与を例えば1～8回、例えば3～5回、繰り返すことができる。投与は、2～24時間の期間、例えば2～12時間の期間にわたる持続注入によって、行うことができる。一態様では、毒性副作用を低減するために、ヒト化またはキメラ抗体を、長時間、例えば24時間以上にわたる、緩慢な持続注入によって投与することができる。

【０３５１】

一態様では、ヒト化またはキメラ抗体を、週に1回投与した場合に8回まで、例えば4～6回にわたって、固定用量として計算された1週間量で投与することができる。そのようなレジメンは、必要に応じて、例えば6ヶ月後または12ヶ月後に、1回または複数回繰り返す

ことができる。そのような固定投薬量は、例えば、体重を70kgと見積もった上で、上記のmg/kg投薬量に基づくことができる。投薬量は、投与後に血液中の本発明のヒト化またはキメラ抗体の量を、例えば生物学的試料を採取し、本発明のヒト化またはキメラ抗体の結合領域を標的とする抗イディオタイプ抗体を使用して測定することによって、決定または調節することができる。

【０３５２】

一態様では、維持療法で、例えば6ヶ月以上の期間にわたって週に1回、ヒト化またはキメラ抗体を投与することができる。

【０３５３】

がんを発症するリスクを低減し、がんの進行におけるある事象の発生の開始を遅延させ、かつ/またはがんが寛解状態にある場合には、再発のリスクを低減するために、ヒト化またはキメラ抗体を予防的に投与することもできる。

【０３５４】

非経口組成物は、投与が容易になり、投薬量が均一になるように、投薬単位形に製剤化することができる。本明細書にいう投薬単位形とは、処置される対象への単位投薬量として好適な物理的に離散した単位を指し、各単位は、所望の治療効果を生じるように計算された前もって決定された分量の活性化合物を必要な薬学的担体と共に含有する。本発明の投薬単位形の仕様は、（a）活性化合物に特有の特徴、および達成しようとする具体的治療効果、および（b）個体における感受性の処置のためにそのような活性化合物を配合する際の当技術分野において固有の制約によって規定されるか、またはそれらに直接依存する。

【０３５５】

がんを発症するリスクを低減し、がんの進行におけるある事象の発生の開始を遅延させ、かつ/またはがんが寛解状態にある場合には、再発のリスクを低減するために、ヒト化またはキメラ抗体を予防的に投与することもできる。他の生物学的因子によって存在することがわかっている腫瘍の位置を特定することが困難な患者では、これがとりわけ有用になりうる。

【０３５６】

診断的応用

本発明のヒト化またはキメラ抗体は、本明細書に記載するヒト化またはキメラ抗体を含む組成物を使って、診断目的にも使用することができる。したがって、本発明は、本明細書に記載のヒト化またはキメラ抗体を使用する診断方法および診断用組成物を提供する。そのような方法および組成物は、例えば疾患を検出しまたは同定することなど、純粋な診断目的に使用することができるし、治療的処置の進展をモニタリングするため、疾患の進行をモニタリングするため、処置後の状態を評価するため、疾患の再発をモニタリングするため、および疾患を発症するリスクを評価するためなどといった目的にも使用することができる。

【０３５７】

一局面において、本発明は、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患を診断する方法であって、本発明のヒト化またはキメラ抗体、本発明の組成物、または本発明の薬学的組成物を対象に投与する工程を含み、任意で該ヒト化またはキメラ抗体が検出可能な作用物質で標識されている方法に関する。

【０３５８】

一局面では、本発明のヒト化またはキメラ抗体が、例えば、前記ヒト化またはキメラ抗体が結合する関心対象の特異的ターゲットを発現する細胞が疾患を示すかまたは病理発生過程に関与する疾患の診断において、患者から採取した試料中のターゲットのレベルまたはその細胞表面に関心対象のターゲットを発現する細胞のレベルを検出することによって、エクスビボで使用される。これは、例えば被験試料を、任意で対照試料と共に、本発明のヒト化またはキメラ抗体と、ターゲットへの抗体の結合が可能な条件下で接触させることによって達成することができる。次に、（例えばELISAを使って）複合体形成を検出す

ることができる。対照試料を試験試料と共に使用する場合は、ヒト化もしくはキメラ抗体または抗体-ターゲット複合体のレベルが両方の試料で解析され、試験試料中の統計的に有意に高いヒト化もしくはキメラ抗体または抗体-ターゲット複合体のレベルは、対照試料と比較して高レベルに存在する試験試料中のターゲットを示す。

【０３５９】

本発明のヒト化またはキメラ抗体を使用することができる従来のイムノアッセイの例として、ELISA、RIA、FACSアッセイ、プラズモン共鳴アッセイ、クロマトグラフィーアッセイ、組織免疫組織化学、ウェスタンブロット、および/または免疫沈降が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【０３６０】

したがって一態様において、本発明は、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患を診断する方法であって、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による抗体、二重特異性抗体、組成物または薬学的組成物を対象に投与する工程を含み、任意で抗体が検出可能なラベルで標識されている方法に関する。

【０３６１】

一態様において、本発明は、試料中のターゲットまたはターゲットを発現する細胞の存在を検出するための方法であって、

試料を、試料中のターゲットへのヒト化またはキメラ抗体の結合が可能な条件下で、本発明のヒト化またはキメラ抗体と接触させる工程、および

複合体が形成されたかどうかを解析する工程

を含む方法に関する。試料は、典型的には、生物学的試料である。

【０３６２】

一態様では、試料が、特異的ターゲットおよび/または前記ターゲットを発現する細胞を含有することがわかっているまたはそれらを含有すると疑われる組織試料である。例えば、ターゲット発現のインサイチュー検出は、患者から組織学標本を取り出し、本発明のヒト化またはキメラ抗体をそのような標本に与えることによって、達成することができる。ヒト化またはキメラ抗体は、標本にヒト化またはキメラ抗体を塗布するか重層することによって与えることができ、次にそれが適切な手段を使って検出される。次に、ターゲットまたはターゲット発現細胞の存在だけでなく、被験組織におけるターゲットまたはターゲット発現細胞の分布も（例えばがん細胞の伝播の評価などに関連して）決定することが可能である。本発明を使用することにより、多種多様な組織学的方法（例えば染色手法）のいずれであっても、そのようなインサイチュー検出を達成するために改変しうることは、当業者には容易に理解されるであろう。

【０３６３】

上記のアッセイでは、結合した抗体を検出することができるように、ヒト化またはキメラ抗体を検出可能な物質で標識することができる。あるいは、結合した（一次）特異的ヒト化またはキメラ抗体を、検出可能な物質で標識された抗体であって一次特異的ヒト化またはキメラ抗体に結合するもので検出することもできる。さらにまた、上記のアッセイでは、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による抗体または二重特異性抗体を含む診断用組成物を使用することができる。したがって一局面において、本発明は、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による抗体または二重特異性抗体を含む診断用組成物に関する。

【０３６４】

試料中のターゲットのレベルは、検出可能な物質で標識されたターゲット標準物質と非標識ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体とを利用する競合イムノアッセイによって推定することもできる。このタイプのアッセイでは、生物学的試料、標識ターゲット標準物質およびターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体を合わせて、非標識ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に結合した標識ターゲット標準物質の量を決定する。生物学的試料中のターゲットの量は、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に結合した標識ターゲット標準物質の量に逆比例する。

【０３６５】
インビトロ診断技法において使用されるターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体、二次抗体および/またはターゲット標準物質に適したラベルとしては、さまざまな酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、および放射性物質が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。適切な酵素の例としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ、適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、およびフィコエリトリンが挙げられる、発光物質の例としてはルミノールが挙げられ、適切な放射性物質の例としては^{125}I、^{131}I、^{35}S、および^{3}Hが挙げられる。

【０３６６】
一局面では、本発明のターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体が、腫瘍などのターゲット発現組織のインビボイメージングに使用される。インビボ法の場合、例えば（Fab'）$_2$、FabおよびFab'フラグメントなどの抗体フラグメントは、迅速な分布動態を持つので、特に有利である。

【０３６７】
インビボイメージングは任意の適切な技法によって行うことができる。例えば、^{99}Tc、^{131}I、^{111}Inまたは他のガンマ線放出同位体で標識されたターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体（例えば抗体またはフラグメント）を使って、腫瘍などのターゲット発現組織におけるターゲット特異的抗体の蓄積または分布を、ガンマシンチレーションカメラ（例えばElscint Apex 409ECTデバイス）で、典型的には低エネルギー高分解能コリメーターまたは低エネルギー万能コリメーターを使って、イメージングすることができる。あるいは、^{89}Zr、^{76}Br、^{18}Fまたは他の陽電子放出放射性核種による標識を使用し、陽電子放射断層撮影法（PET）を使って、腫瘍におけるターゲット特異的ヒト化もしくはキメラ抗体または抗体フラグメントの分布をイメージングすることもできる。このような技法を利用して得られるイメージは、例えばがん/腫瘍細胞の存在に関するバイオマーカーとしてターゲットを使用する場合などに、患者、哺乳動物、または組織におけるターゲットの生体内分布を評価するために使用することができる。この技法の変法としては、ガンマカメラ技法よりイメージングを改良するための磁気共鳴イメージング（MRI）の使用を挙げることができる。従来のイムノシンチグラフィ法とその原理は、例えば［79］、［80］、および［81］に記載されている。さらにまた、上記に加えて、または上記に代えて、そのようなイメージは、腫瘍を除去するための外科的技法の基礎としても役立ちうる。さらにまた、そのようなインビボイメージング技法は、患者が腫瘍を有することは（他のバイオマーカー、転移などの存在などによって）確認されるが、その腫瘍を伝統的な解析技法では同定することができない状況において、腫瘍の同定および位置特定も可能にする。これらの方法はいずれも本発明の特徴である。

【０３６８】
本発明が提供するインビボイメージングおよび他の診断方法は、ヒト患者（例えば以前にがんと診断されたことがない患者、またはがんからの回復/寛解期にある患者）における微小転移の検出には特に有用である。

【０３６９】
一態様において、本発明は、本発明のターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体が、検出を助長する放射線不透過性物質にコンジュゲートされ、そのコンジュゲートヒト化またはキメラ抗体が血流への注射などによって宿主に投与され、宿主における標識ヒト化またはキメラ抗体の存在および場所がアッセイされるインビボイメージング法を提供する。この技法および本明細書に記載する他の診断方法によって、本発明は、ヒト患者またはヒト患者から採取した生物学的試料における疾患関連細胞の存在についてスクリーニングし、かつ/またはターゲット特異的ADC療法に先だってターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗

体の分布を評価するための方法を提供する。
【０３７０】
画像診断の場合は、放射性同位体をターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に直接的にまたは中間官能基を使って間接的に結合させることができる。有用な中間官能基として、エチレンジアミン四酢酸およびジエチレントリアミン五酢酸が挙げられる（例えば［82］参照）。
【０３７１】
診断方法は、放射性同位体および放射線不透過性物質の他に、色素（例えばビオチン-ストレプトアビジン複合体を使って）、造影剤、蛍光化合物または分子、および磁気共鳴イメージング（MRI）用の増強剤（例えば常磁性イオン）にコンジュゲートされたターゲット特異的抗体を使って行うこともできる（例えば、MRI技法およびMRI増強剤にコンジュゲートされた抗体の調製について記述している［83］を参照されたい）。そのような診断/検出剤は、MRIで使用される作用物質および蛍光化合物から選択することができる。ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に放射性金属または常磁性イオンを負荷するには、それを、長いテールを有する試薬と反応させ、そのテールに、イオンを結合するための複数のキレート基を取り付ける必要があるかもしれない。そのようなテールは、ポリリジン、多糖などのポリマー、または例えばこの目的に有用であることが公知であるポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビスチオセミカルバゾン、ポリオキシムなどのキレート基を結合させることができるペンダント基を有する他の誘導体化されたまたは誘導体化可能な鎖であることができる。キレートは、標準的な化学を使って、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体にカップリングすることができる。
【０３７２】
したがって本発明は、診断用ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体であって、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体が、造影剤（例えば磁気共鳴イメージング用、コンピュータ断層撮影用、または超音波コントラスト増強剤）、または例えばガンマ放出同位体、ベータ放出同位体、アルファ放出同位体、オージェ電子放出同位体、もしくは陽電子放出同位体でありうる放射性核種にコンジュゲートされているものを提供する。
【０３７３】
一局面において、本発明は、本発明の抗体または二重特異性抗体を含む診断用組成物に関する。
【０３７４】
さらに別の局面において、本発明は、試料中のターゲット抗原またはターゲット抗原を発現する細胞の存在を検出するためのキットであって、
本発明のターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体、および
そのキットの使用説明書
を含むキットに関する。
【０３７５】
したがって一局面において、本発明は、
a）試料を、抗体または二重特異性抗体とCD3の間の複合体の形成が可能な条件下で、本発明の抗体または二重特異性抗体と接触させる工程、および
b）複合体が形成されたかどうかを解析する工程
を含む、試料中のCD3抗原またはCD3発現細胞の存在を検出するためのキットを提供する。
【０３７６】
一態様において、本発明は、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体を含む容器、およびターゲットに対するターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体の結合を検出するための1つまたは複数の試薬を含む、がんを診断するためのキットを提供する。試薬としては、例えば蛍光タグ、酵素タグ、または他の検出可能タグを挙げることができる。試薬として、二次もしくは三次抗体または酵素反応のための試薬を挙げることもでき、この場合、その酵素反応は可視化することができる生成物を生じる。一態様において、本発明は、適切な容器中の標識型または非標識型の1つまたは複数の本発明のターゲット特異的ヒト化

またはキメラ抗体、間接的アッセイのためのインキュベーション用試薬、およびラベルの性質に依存して、そのようなアッセイにおける検出のための基質または誘導体化剤を含む診断キットを提供する。対照試薬および使用説明書も含めることができる。

【０３７７】

組織試料または宿主におけるターゲットの存在を検出するために、標識ターゲット特異的抗体などのターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体と共に使用するための診断キットを供給することもできる。そのような診断キット、ならびに本明細書の他の項に記載する治療的使用のためのキットでは、典型的には、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体を、凍結乾燥形態で容器中に、単独で、またはターゲット細胞またはターゲットペプチドに特異的な追加抗体と一緒に、提供することができる。典型的には、薬学的に許容される担体（例えば不活性希釈剤）および/またはその構成要素、例えばトリス、リン酸塩、または炭酸塩緩衝液、安定剤、保存剤、殺生物剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミンなど（典型的には混合用の別個の容器に入れて）や追加の試薬（やはり典型的には別個の容器に入れて）も含まれる。一定のキットでは、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に結合する能力を有する二次抗体であって、典型的には別個の容器に入っているものも含まれる。第2抗体は、典型的にはラベルにコンジュゲートされ、本発明のターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体と類似する方法で製剤化される。上記の、そして本明細書の他の項に記載する方法を使用することにより、がん/腫瘍細胞のサブセットを定義づけ、そのような細胞および関連腫瘍組織を特徴づけるために、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体を使用することができる。

【０３７８】

抗イディオタイプ抗体

さらに別の局面において、本発明は、本明細書に記載する発明のヒト化またはキメラ抗体に結合する抗イディオタイプ抗体に関する。

【０３７９】

抗イディオタイプ（Id）抗体は、一般に抗体の抗原結合部位に関連するユニークな決定基を認識する抗体である。抗Id抗体は、CD3モノクローナル抗体の供給源と同じ種および遺伝子型の動物を、抗Idを調製しようとしているモノクローナル抗体で免疫化することによって調製することができる。免疫化した動物は、典型的には、これらのイディオタイプ決定基に応答する抗体（抗Id抗体）を生産することによって、免疫化抗体のイディオタイプ決定基を認識し、それに応答することができる。そのような抗体は、例えばUS4,699,880に記載されている。そのような抗体は本発明のさらなる特徴である。

【０３８０】

抗Id抗体は、さらに別の動物における免疫応答を誘発していわゆる抗抗Id抗体を生産するための「免疫原」としても使用することができる。抗抗Id抗体は、エピトープ的には、抗Id抗体を誘導した元のモノクローナル抗体と同一でありうる。したがって、モノクローナル抗体のイディオタイプ決定基に対する抗体を使用することにより、同一の特異性を持つ抗体を発現する他のクローンを同定することが可能である。抗Id抗体を、任意の適切な技法によって、例えば本発明のCD3特異的抗体に関して本明細書の他の項で述べるような技法によって、変化させ（それによって抗Id抗体変異体を生産し）、かつ/または誘導体化することができる。例えばモノクローナル抗Id抗体を、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）などの担体にカップリングし、それを使ってBALB/cマウスを免疫化することができる。これらのマウスからの血清は、典型的には、元の/親CD3抗体と同一ではないとしても類似する結合特性を有する抗抗Id抗体を含有するであろう。

【０３８１】

配列

【表１】

SEQ ID NO:	**クローン名**	**配列**
SEQ ID NO:1	huCD3 VH CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	huCD3 VH CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	huCD3 VH CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:4	huCD3 VL CDR1	TGAVTTSNY
	huCD3 VL CDR2	GTN
SEQ ID NO:5	huCD3 VL CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:6	huCD3 VH1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSL YLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:7	huCD3 VH2	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS

SEQ ID NO:8	huCD3 VH3	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:9	huCD3 VH4	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSIL YLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTM VTVSS
SEQ ID NO:10	huCD3 VL1	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQA DDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:11	huCD3 VL2	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQA DDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:12	huCD3 VL3	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ TPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQA DDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:13	成熟ヒトCD3ε（イプシロン）	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHN DKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGS KPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLL LLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPN PDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI
SEQ ID NO:14	ヒトCD3δ（デルタ）	FKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRI LDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVA GIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQ VYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
SEQ ID NO:15	IgG1m(f) 重鎖定常領域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
SEQ ID NO:16	IgG1m(f)-LFLEDA 重鎖定常領域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**FE**GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVV**A**VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:17	VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGLE WVATISRYSRYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YCARRPLYGSSPDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:18	VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQAPRLLIYD TSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCFQGSGYPLTFGS GTKLEMR
SEQ ID NO:19	VH HER2 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLE WMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDT AVYYCARDRIVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO:20	VL HER2 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRT FGQGTKVEIK
SEQ ID NO:21	成熟カニクイザルCD3ε（イプシロン）	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKE DSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENC MEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQQDLYSGLNQRRI
SEQ ID NO:22	成熟アカゲザルCD3ε（イプシロン）	QDGNEEMGSITQTPYHVSISGTTVILTCSQHLGSEVQWQHNGKNKE DSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENC MEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQQDLYSGLNQRRI
SEQ ID NO:23	IgG1m(f)-F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:24	IgG1m(f)-K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:25	IgG1m(f)-LFLEDA-F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:26	IgG1m(f)-LFLEDA-K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO:27	親マウスVH	EVKLLESGGGLVQPKGSLKLSC AASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSQSILYLQMNNL KTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSA

SEQ ID NO:28	親マウスVL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTC RSSTGAVTTSNYANWVQEKPDH LFTGLIGGTNKRAPGVPARFSG SLIGDKAALTITGAQTEDEAIY FCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:29	VH CD20 – 7D8	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAASGFTFHDYAMHWVRQA PGKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMD VWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:30	VL CD20 – 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK

【実施例】

【０３８２】

実施例1：ヒト化CD3抗体および非活性化抗体変異体の作製

CD3抗体のヒト化

マウスCD3抗体（US8,236,308、本明細書ではIgG1-CD3と記す）のヒト化は、Antitope（英国ケンブリッジ）により、彼らの改良版生殖細胞系ヒト化（CDR移植）技術（EP0629240）を使って行われた。この技術を使って、4つの異なるVH鎖（SEQ ID NO：6、7、8、および9）と3つの異なるVL鎖（SEQ ID NO：10、11、および12）が設計された。これら4つのVHを3つのVL鎖と組み合わせることにより、12の異なる抗体を作製した。これらのヒト化変異体を本明細書ではhuCD3と記す。したがって、本発明のVHとVLを含むヒト化変異体は、例えばIgG1-huCD3-H1L1と記され、これは該特定変異体が、IgG1アイソタイプであり、ヒト化CD3であって、「H1」と名付けられSEQ ID NO：6に定義するVHアミノ酸配列と、「L1」と名付けられSEQ ID NO：10に定義するVLアミノ酸配列とを含むことを意味する。したがって、例えばH1は可変重鎖領域VH1を指し、L1は可変軽鎖領域VL1を指すことになる。

【０３８３】

具体的に述べると、本明細書に記載する実施例では、変異体IgG1-huCD3-H1L1（SEQ ID NO：6に示すVH1配列とSEQ ID NO：10に示すVL1配列とを含むヒト化CD3）、IgG1-huCD3-H1L2（SEQ ID NO：6に示すVH1配列とSEQ ID NO：11に示すVL2配列とを含むヒト化CD3）、IgG1-huCD3-H1L3（SEQ ID NO：6に示すVH1配列とSEQ ID NO：12に示すVL3配列とを含むヒト化CD3）、IgG1-huCD3-H3L3（SEQ ID NO：8に示すVH3配列とSEQ ID NO：12に示すVL3配列とを含むヒト化CD3）、IgG1-huCD3-H4L1（SEQ ID NO：9に示すVH4配列とSEQ ID NO：10に示すVL1配列とを含むヒト化CD3）、IgG1-huCD3-H3L1（SEQ ID NO：8に示すVH3配列とSEQ ID NO：10に示すVL1配列とを含むヒト化CD3）、IgG1-huCD3-H3L3（SEQ ID NO：8に示すVH3配列とSEQ ID NO：12に示すVL3配列とを含むヒト化CD3）、およびIgG1-huCD3-H4L3（SEQ ID NO：9に示すVH4配列とSEQ ID NO：12に示すVL3配列とを含むヒト化CD3）を作製し、試験した。

【０３８４】

いくつかの実施例では、huCLB-T3/4の重鎖および軽鎖可変領域配列（それぞれSEQ ID NO：17および18）を含む抗体を対照抗体として（Labrijn et al., PNAS 2013, 110：5145-50）、またFc領域における異なる非活性化変異の組合せを検証するために使用した（実施例8～10参照）。huCBL-T3/4はヒト化型のマウスCD3抗体CLB-T3/4である（Parren et al., Res Immunol. 1991, 142（9）749-63）。両配列（SEQ ID NO：17および18）を適切なpcDNA3.3（Invitrogen）発現ベクターにクローニングし、HEK293F細胞への同時トランスフェクションによって発現させた。その結果得られた対照抗体をIgG1-huCLB-T3/4と記す。

【０３８５】

いくつかの実施例では、CD20抗体7D8の重鎖および軽鎖可変領域配列（VH配列に対応するSEQ ID NO：29およびVL配列に対応するSEQ ID NO：30）を含む抗体を、陽性対照として使用した。陽性対照との関連において使用する場合、これを「IgG1-CD20」と名付ける。

【０３８６】

これらのIgG1-CD3（すなわちキメラ親CD3抗体）、IgG1-huCD3およびIgG1-huCLB-T3/4抗体を単一特異性フォーマットおよび二重特異性フォーマットで使用し、二重特異性抗体は

後述のように作製した。

【０３８７】

HER2抗体

一部の実施例では、HER2に対する抗体を使用した。このHER2特異的抗体（抗体169）のVH配列およびVL配列（それぞれSEQ ID NO：19および20）は以前に記載されている（WO2012/143524［Genmab］;Labrijn et al., PNAS 2013, 110：5145-50）。この抗体は、単一特異性フォーマットでも二重特異性フォーマットでも使用した。これを「IgG1-HER2」と名付ける。

【０３８８】

b12抗体

一部の実施例では、gp120特異的抗体である抗体b12（Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230（3）812-23）を陰性対照として使用した。これを「IgG1-b12」と名付ける。

【０３８９】

発現

抗体は、後述の非活性化変異を持つか、または非活性化変異を持たず、後述の方法による二重特異性抗体の作製を可能にするCH3ドメイン中の変異を持つ、IgG1,κまたはIgG1,λとして発現させた：IgG1-HER2-K409R、IgG1-b12-K409R、IgG1-CD3-F405L。293fectin（米国Invitrogen）を基本的に製造者の説明どおりに使用することで、抗体の重鎖と軽鎖の両方をコードするプラスミドDNA混合物を、Freestyle HEK293F細胞（米国Invitrogen）に一過性にトランスフェクトした。

【０３９０】

抗体の精製

培養上清を0.2μmデッドエンドフィルタでろ過し、5mL MabSelect SuReカラム（GE Health Care）にローディングし、0.1Mクエン酸ナトリウム-NaOH（pH3）で溶出させた。溶出物を2Mトリス-HCl（pH9）で直ちに中和し、12.6mM NaH2P04、140mM NaCl、pH7.4（B.Braun）に対して終夜透析した。あるいは精製に続いて、溶出物をHi Prep脱塩カラムにローディングし、抗体を12.6mM NaH2P04、140mM NaCl、pH7.4（B.Braun）緩衝液に交換した。透析後または緩衝液交換後に、試料を0.2μmデッドエンドフィルタで滅菌ろ過した。純度をSDS-PAGEで決定し、濃度を280nmの吸光度で測定した。精製抗体は2～8℃で保存した。

【０３９１】

二重特異性抗体の作製

二重特異性抗体は、DuoBody（登録商標）プラットフォーム技術、すなわちWO2011/147986およびLabrijnら（Labrijn et al., PNAS 2013, 110：5145-50;Gramer et al., MAbs 2013, 5：962-973）に記載の2-MEA誘発Fabアーム交換を使って、インビトロで作製した。この方法による二重特異性抗体の生産を可能にするために、CH3ドメイン中に単一の変異、すなわち一方の親IgG1抗体ではF405L変異（すなわちIgG1-CD3抗体）、他方の親IgG1抗体ではK409R変異（すなわちHER2またはb12抗体）を保因するIgG1分子を作製した。二重特異性抗体を作製するために、これら2つの親抗体を、各抗体の最終濃度を0.5mg/mLにして、25mMまたは75mMの2-メルカプトエチルアミン-HCl（2-MEA）と共に、総体積500μLのTE中、31℃で5時間インキュベートした。還元反応は、25mLのPBSで平衡化したPD-10カラム（GE-healthcare、製品番号17-0851-01）を使って還元剤2-MEAが除去された時に停止した。脱塩に先だって、体積を2.5mLに調節するために、2mLのPBS（B.Braun、製品番号3623140）を試料に加えた。溶出は3.5mLのPBSで行った。Amicon Ultra遠心ユニット（30kD MWCO、Millipore、製品番号UFC803096）に試料を集め、3000×gで8分間の遠心によって濃縮した。体積を（必要ならば）PBSで500μLに調節し、0.2μmフィルタ（Millex-GV、製品番号SLGV004SL）で試料を滅菌ろ過した。二重特異性産物は2～8℃で保存した。

【０３９２】

同じ二重特異性抗体を与える代替的一方法では、二重特異性抗体を作製するために、100μgの2つの親抗体を混合し、75mM 2-メルカプトエチルアミン-HCl（2-MEA）と共に、総体積400μLのPBS（B.Braun、製品番号3623140）中、31℃で5時間インキュベートした。還

元反応は、Amicon Ultra 0.5ml遠心ユニット（10kD MWCO、Millipore、製品番号UFC501096）を使って13000×gで10分間の遠心により400μLのPBSで4回洗浄することで還元剤2-MEAが除去された時に停止した。フィルタを裏返し、1000gで2分間遠心することによって、試料を新しいチューブに集めた。体積を（必要ならば）PBSで200μLに調節した。最終濃度を決定するために二重特異性産物の280nmの吸光度（A280）を測定した。HPLCカチオン交換クロマトグラフィー（HPLC-CEX）（WO2013/060867に記載）を行って二重特異性産物の量を決定した。試料を2～8℃で保存した。

【０３９３】

作製された二重特異性抗体を、以下の説明では「K409R IgG1バックボーン」および「F405L IgG1バックボーン」と記す。

【０３９４】

非活性化変異

Fc領域に1つまたは複数のアミノ酸置換を持つ抗体変異体をいくつか作製した。非活性化Fc領域は、抗体が単球などの血液細胞上に存在するFc受容体と相互作用するのを防止し、または抗体がC1qと相互作用して古典的補体経路を活性化するのを防止する。Fc領域にアミノ酸置換の異なる組み合わせを含有する抗体変異体において、Fc活性の低減を調べた。最大5個のアミノ酸置換を導入した。これには、変異N297Q、L234A、L235A、L234F、L235E、D265A、およびP331Sが含まれる。これら5つのアミノ酸位置の1つまたは複数における置換を、K409Rおよび/またはF405L IgG1バックボーンに導入した。huCLB-T3/4抗体の以下のFc領域変異体を作製した：N297Q（N297Q置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-N297Qと名付ける）、LFLE（L234F/L235E置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-LFLEと名付ける）、LALA（L234A/L235A置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-LALAと名付ける）、LFLENQ（L234F/L235E/N297Q置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQと名付ける）、LFLEDA（L234F/L235E/D265A置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDAと名付ける）、DA（D265A置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-DAと名付ける）、DAPS（D265A/P331S置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-DAPSと名付ける）、DANQ（D265A/N297Q置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-DANQと名付ける）、LFLEPS（L234F/L235E/P331S置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPSと名付ける）およびLFLEDANQPS（L234F/L235E/D265A/N297Q/P331S置換を指す。IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPSと名付ける）。

【０３９５】

具体的には、IgG1-huCD3抗体変異体において、変異L234F、L235EおよびD265Aを含みLFLEDAと呼ばれる3つのアミノ酸置換の組み合わせを、K409RおよびF405L IgG1バックボーンに導入することによって、非活性化Fc領域を持つ抗体を作製した。その結果得られた非活性化抗体変異体は、接尾語「-LFLEDA」をつけて名付けられる。

【０３９６】

実施例2：CD3を発現するヒトおよびカニクイザルT細胞株に対するヒト化CD3抗体およびその非活性化変異体の結合

Fc領域にLFLEDA変異を持つまたは持たないヒト化CD3（huCD3）抗体および二重特異性（bs）IgG1-huCD3×HER2分子の精製変異体（実施例1参照）の、ヒトT細胞株Jurkat（クローンE6-1、ATCC（登録商標）TIB-152（商標）、LGC Standards GmbH、ドイツ国ヴェーゼル）またはカニクイザルT細胞株HSC-F（カタログ番号JCRB1164;ヒューマンサイエンス研究資源バンク、日本国大阪）に対する結合を、FACS解析によって解析した。抗体変異体は、非活性化変異LFLEDAに加えて、実施例1で述べたようにF405LまたはK409R変異を含有した。

【０３９７】

細胞（1×10^5細胞/ウェル）を、ポリスチレン96ウェル丸底プレート（Greiner bio-one 650101）中で、抗体調製物の段階希釈液（3倍希釈で5～10,000ng/mLの範囲）と共に、100μLのPBS/0.1%BSA/0.02%アジド中、4℃で30分間インキュベートした。

【０３９８】

PBS/0.1%BSA/0.02%アジド中で2回洗浄した後、細胞を100μL中で二次抗体と共に4℃で30分間インキュベートした。全ての実験に二次抗体として、PBS/0.1%BSA/0.02%アジ

ド中に1：100希釈したR-フィコエリトリン（PE）コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG F（ab'）2（109-116-098、Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.、ペンシルベニア州ウエストグローブ）を使用した。次に、細胞をPBS/0.1%BSA/0.02%アジドで2回洗浄し、150μLのPBS/0.1%BSA/0.02%アジドに再懸濁し、FACS Cantoll（BD Biosciences）で解析した。GraphPad Prism V5.04ソフトウェア（GraphPad Software、米国カリフォルニア州サンディエゴ）を使って非線形回帰（傾き可変のシグモイド用量応答）で結合曲線を解析した。

【０３９９】

図1Aは、野生型Fc領域を持つIgG1λ-huCD3変異体IgG1-huCD3-H1L1（それぞれSEQ ID NO：6および10）、IgG1-huCD3-H1L2（それぞれSEQ ID NO：6および11）、IgG1-huCD3-H1L3（それぞれSEQ ID NO：6および12）、IgG1-huCD3-H3L3（それぞれSEQ ID NO：8および12）およびIgG1-huCD3-H4L1（それぞれSEQ ID NO：9および10）の、Jurkat細胞に対する結合が、全ての変異体について観察されたこと、およびIgG1-CD3-LFLEDA（非活性化LFLEDA変異を持つ実施例1に記載の親CD3抗体）および非活性化LFLEDA変異を持つIgG1-huCD3-H3L1-LFLEDAの結合能力が、野生型Fc領域を持つhuCD3変異体と類似していたことを表している。陽性対照として含めたIgG1-huCLB-T3/4の結合は、Jurkat細胞に対して、IgG1-huCD3変異体と比較して強かった。陰性対照抗体IgG1-b12については結合が観察されなかった。

【０４００】

図6Aは、非活性化LFLEDA変異を持つIgG1-CD3-LFLEDA（非活性化LFLEDA変異を持つ実施例1に記載の親CD3抗体）、IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA、IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA、IgG1-3huCD3-H1L1-LFLEDA、IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA、IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA、およびIgG1-huCD3-H4L3-LFLEDAの、Jurkat細胞への結合が、野生型Fc領域を持つhuCD3変異体の結合能力と類似していることを表している。陽性対照として含めたIgG1-huCLB-T3/4の結合は、Jurkat細胞に対して、低抗体濃度ではIgG1-huCD3変異体と比較して強かったが、高抗体濃度では類似していた。全体として、ヒト化CD3変異体は、IgG1-CD3抗体としてCD3に対する結合能力を維持していた。陰性対照抗体IgG1-b12については結合が観察されなかった。

【０４０１】

図1Bは、二重特異性抗体変異体bsIgG1 CD3×HER2、bsIgG1 CD3×b12-LFLEDA、およびbsIgG1 huCD3-H3L1×HER2-LFLEDAもJurkat細胞に結合することを表している。これらの二重特異性抗体の最大結合値は、単一特異性抗体の最大結合値より高い。二重特異性抗体のEC50濃度は、6～10倍高かった。ここでも、陰性対照抗体IgG1-b12については、結合が観察されなかった。

【０４０２】

図6Bは、二重特異性非活性化Fc抗体変異体bsIgG1 huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA、およびbsIgG1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDAもJurkat細胞に結合することを表している。これらの二重特異性抗体の最大結合値は、単一特異性抗体の最大結合値より高い。二重特異性抗体のEC50濃度は4～10倍高かった。一価結合は、より多くの抗体が細胞表面に蓄積することを可能にするので、結合値は二重特異性抗体の方が高くなる。ここでも、陰性対照抗体IgG1-b12については、結合が観察されなかった。

【０４０３】

図2Aは、野生型Fc領域を持つIgG1-huCD3変異体IgG1-huCD3-H1L1、IgG1-huCD3-H1L2、IgG1-huCD3-H1L3、IgG1-huCD3-H3L3、およびIgG1-huCD3-H4L1ならびにIgG1-CD3-LFLEDA、IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDAの、カニクイザルT細胞株HSC-Fへの結合が、類似していたことを表している。カニクイザルCD3と交差反応しない対照抗体huCLB-T3/4と、陰性対照抗体IgG1-b12については、結合が観察されなかった。

【０４０４】

図7Aは、カニクイザルT細胞株HSC-Fに対するIgG1-huCD3変異体IgG1-CD3-LFLEDA、IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA、IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA、IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA、IgG1-huCD3-H1

L3-LFLEDA、IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA、およびIgG1-huCD3-H4L3-LFLEDAの結合が類似していたことを表している。陰性対照抗体IgG1-b12については結合が観察されなかった。

【０４０５】

図2Bは、二重特異性抗体変異体bsIgG1 CD3×HER2およびbsIgG1 huCD3-H3L1-LFLEDAもHSC-F細胞に結合することを表している。これらの二重特異性抗体の最大結合値は単一特異性抗CD3変異体の最大結合値より高い。二重特異性抗体のEC50濃度は単一特異性抗CD3抗体のEC50濃度より10～12倍高かった。ここでも陰性対照抗体IgG1-b12については結合が観察されなかった。

【０４０６】

図7Bは、二重特異性非活性化Fc抗体変異体bsIgG1 huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA、およびbsIgG1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDAも、HSC-F細胞に結合することを表している。これらの二重特異性抗体の最大結合値は単一特異性抗CD3変異体の最大結合値より高い。二重特異性抗体のEC50濃度は単一特異性抗huCD3抗体のEC50濃度より3～6倍高かった。ここでも陰性対照抗体IgG1-b12については結合が観察されなかった。

【０４０７】

実施例3：ヒト化CD3抗体変異体によるT細胞活性化

CD69発現はT細胞活性化の初期マーカーである。CD3抗体は、T細胞が発現するCD3の結合と、抗体のFc領域（例えばIgG1 Fc領域）による免疫細胞が発現するFc受容体の結合とによって、T細胞と免疫細胞との架橋を媒介しうる。これはT細胞活性化およびCD69の誘導につながりうる。非活性化Fc領域（LFLEDA変異）を含有する抗体変異体はFc受容体に結合しない。それゆえに、非活性化CD3抗体はT細胞活性化およびCD69発現を誘発しないと予想された。というのも、非活性化Fc領域はFc受容体を発現する免疫細胞に結合せず、したがってT細胞と免疫細胞とを架橋することができないからである。

【０４０８】

Fc領域中にLFLEDA変異を持つヒト化CD3（huCD3）変異体およびFc領域中にLFLEDA変異を持たないヒト化CD3（huCD3）変異体と共にインキュベートした後のT細胞の初期活性化を決定するために、T細胞上のCD69発現をFACS解析によって評価した。LFLEDA変異体は、非活性化変異に加えて、実施例1で述べたF405L変異またはK409R変異を含有する。

【０４０９】

Leucosepチューブ（番号227290;Greiner Bio-one、オランダ国アルフェン・アーン・デン・レイン）を使った密度勾配分離によって全血またはバフィーコートからPBMCを単離し、PBSで洗浄し、培養培地に再懸濁した。

【０４１０】

huCD3抗体変異体、陰性対照（IgG1-b12）および陽性対照（IgE-huCD3および親IgG1-CD3）の用量応答系列を培養培地に調製し（10倍希釈で0.1～1,000ng/mLの範囲）、ヒトまたはカニクイザルPBMCが入っている96ウェル丸底プレートのウェルに加えた。16～24時間のインキュベーション後に、細胞を遠心分離によってペレット化し、上清（サイトカインを含有している）を収集し、-20℃で保存した。次に、細胞をPBS/0.1%BSA/0.02%アジドで洗浄し、カニクイザルのCD28およびCD69と交差反応するマウス抗ヒトCD28-PE（854.222.010;Sanquin、オランダ国アムステルダム;T細胞マーカー）およびマウス抗ヒトCD69-APC抗体（340560;BD Biosciences、ニュージャージー州フランクリンレイクス）を使って、4℃で30分間染色した。PBS/0.1%BSA/0.02%アジドで2回洗浄することによって未結合の抗体を除去した。細胞を150μL/ウェルに再懸濁し、CD28陽性細胞上のCD69発現をFACS Canto II（BD Biosciences）で測定した。

【０４１１】

図3は、野生型IgG1 Fc領域を持つIgG1-CD3（実施例1に記載するもの）とヒト化IgG1-huCD3変異体とが、ヒト由来（図3A）およびカニクイザル由来（図3B）のT細胞において、類似するレベルのCD69発現を誘発したことを表している。非活性化（LFLEDA）IgG1-CD3-LFL

EDAおよびIgG1-huCD3-H3L1変異体は、ヒトT細胞において低レベルのCD69発現を誘発した。カニクイザルT細胞では非活性化IgG1-huCD3変異体によって誘発されるCD69の発現はなかった。対照抗体IgG1-b12も、ヒトT細胞およびカニクイザルT細胞において、CD69の発現を誘導しなかった。

【０４１２】

図8は、非活性化（LFLEDA）IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA、IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA、IgG1-3huCD3-H1L1-LFLEDA、IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA、IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA、およびIgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA変異体が、ヒトT細胞において、低レベルのCD69発現を誘発したことを表している。図8Aおよび8Bは、カニクイザル由来のT細胞におけるCD69発現の誘発を表している。観察された非活性化変異体によるわずかな活性化は、CD3抗体の二価結合によるCD3分子の架橋のせいかもしれない。この説明は、抗体結合が一価になる最高濃度では活性化が低減するという観察結果によって裏付けられる。対照抗体IgG1-b12も、ヒトT細胞およびカニクイザルT細胞においてCD69の発現を誘発しなかった。

【０４１３】

図8Cおよび8Dは、非活性化二重特異性抗体変異体bsIgG1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA、およびbsIgG1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDAが、ヒト（図8C）またはカニクイザル（図8D）由来のT細胞におけるCD69の発現を誘発しないことを表している。ただし、さらに高い抗体濃度では、CD69発現の多少の誘発が観察された。

【０４１４】

実施例4：ヒト化CD3抗体変異体によって誘発されるT細胞増殖

ヒトおよびカニクイザルT細胞の増殖に対するヒト化CD3（huCD3）抗体変異体（実施例1に記載したもの）の効果を、Roche Applied Scienceの細胞増殖ELISAキット（Cell Proliferation ELISA, BrdUキット、番号11647229001;Roche Applied Science、ドイツ国マンハイム）によって評価した。評価は製造者の説明書に従って行った。

【０４１５】

全血またはバフィーコートから単離したヒトまたはカニクイザルPBMCを、96ウェル培養プレート中で、IgG1 huCD3抗体変異体の希釈系列（10倍希釈で0.1～1,000ng/mLの範囲）と共にインキュベートした。IgE-CD3およびIgG1-huCLB-T3/4を陽性対照として含め、IgG1-b12を陰性対照として含めた。抗体と共に3日間インキュベートした後、BrdU（Roche Applied Science、ドイツ国マンハイム）を培地に加え、プレートを5時間インキュベートした。次に、細胞を遠心分離によってペレット化し、上清を収集し、-20℃で保存した。プレートを乾燥し、ELISAを行うまで4℃で保存した。

【０４１６】

DNAへのBrdUの取り込みは、製造者の説明書（Roche Applied Science）に従ってELISAによって決定した。細胞をプレートに固定した後、ペルオキシダーゼとコンジュゲートされた抗BrdU抗体と共に、プレートを室温で90分間インキュベートした。プレートをPBSTで洗浄し、（キットと共に提供されるTMB溶液ではなく）ABTS緩衝液を使って、結合を検出した。30分後にウェルに2％シュウ酸を加えることによって発色を停止した。次にEL808 ELISAリーダーでOD405nmを測定した。

【０４１７】

図4は、PBMCを親IgG1-CD3および野生型IgG1 Fc領域を持つヒト化IgG1-huCD3変異体と共にインキュベートすると、極めて低い抗体濃度でさえ、ヒトT細胞（図4A）およびカニクイザルT細胞（図4B）の強い増殖が誘発されたことを表している。IgG1-huCD3抗体の非活性化LFLEDA変異体と共にインキュベートしても、ヒトT細胞（図4Aおよび9A）およびカニクイザルT細胞（図4Bおよび9B）の増殖は誘発されなかった。したがって、IgG1-huCD3抗体の非活性化変異体は、（実施例3に示すように）ヒトT細胞において低レベルのCD69発現を誘発したが、これらの非活性化IgG1-huCD3変異体ではヒトT細胞の増殖は誘発されなかった。

【０４１８】
図9Cおよび9Dは、非活性化二重特異性抗体変異体bsIgG1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA、およびbsIgG1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDAが、ヒト（図9C）およびカニクイザル（図9D）から単離されたT細胞の増殖を誘発しないことを表している。
【０４１９】
実施例5：ヒト化CD3抗体変異体によって誘発されるインビトロT細胞媒介性細胞傷害
腫瘍特異的T細胞性細胞傷害は、一方のアームでCD3に結合し、他方のアームでHER2などの腫瘍特異的ターゲットに結合する二重特異性抗体によって媒介することができる。二重特異性抗体がT細胞と腫瘍細胞の両方に同時に結合すれば、T細胞活性化と腫瘍細胞特異的細胞傷害につながるであろう。この実施例では、HER2陽性腫瘍細胞に対するT細胞媒介性細胞傷害を、CD3（ヒト化変異体）とHER2に対する二重特異性抗体を使って評価した。
【０４２０】
そこで、10％（vol/vol）熱失活CCS、1.5g/L炭酸水素ナトリウム（Lonza）、1mMピルビン酸ナトリウム、4.5g/Lグルコース（Sigma）、50IU/mLペニシリン、および50μg/mLストレプトマイシンを補足したRPMI1640中で、AU565（ヒト乳癌）細胞を培養した。細胞株を5％（vol/vol）CO_2湿潤インキュベータ中で37℃に維持した。AU565細胞をほぼコンフルエントまで培養した後、細胞をトリプシン処理し、培養培地中に再懸濁し、セルストレーナーに通すことで、単細胞懸濁液を得た。96ウェル培養プレートの各ウェルに5×10^4細胞を播種し、細胞を37℃、5％CO_2で少なくとも3時間インキュベートすることで、プレートに接着させた。
【０４２１】
ヒトまたはカニクイザルPBMCを全血またはバフィーコートから単離した。単離されたPBMCをPBSで洗浄し、培養培地中に再懸濁し、96ウェルプレート中のAU565腫瘍細胞に1：1の比で加えた。カニクイザルCD3と交差反応するマウス抗ヒトCD3-PerCP（BD、番号345766）抗体（T細胞染色用）を使って、FACS解析により、PBMC中に存在するT細胞のパーセンテージを測定した。使用したPBMC集団中のT細胞含量は典型的には50～60％であった。
【０４２２】
二重特異性抗体変異体bsIgG1 CD3×HER2-LFLEDA、bsIgG1 CD3×b12-LFLEDA、bsIgG1 huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA、およびbsIgG1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDAの希釈系列（0.001ng/mLから10,000ng/mLまでの範囲の最終濃度）を培養培地中に調製し、プレートに加えた。IgG1-HER2-LFLEDAおよびIgG1-b12を対照として含めた。LFLEDA抗体変異体は、非活性化変異に加えて、二重特異性フォーマットで調製するためのF405L変異またはK409R変異を含有している（実施例1参照）。プレートを37℃、5％CO_2で3日間インキュベートした。100％腫瘍細胞殺滅の基準として、細胞を1μMスタウロスポリン（番号S6942-200、Sigma）と共にインキュベートした。プレートをPBSで2回洗浄し、10％アラマーブルーを含有する150μLの培養培地を各ウェルに加えた。プレートを37℃、5％CO_2で4時間インキュベートした。590nmにおける吸光度を測定した（Envision、Perkin Elmer、マサチューセッツ州ウォルサム）。
【０４２３】
二重特異性CD3×HER2-LFLEDA抗体変異体（bsIgG1-huCLB-T3/4×HER2-LFLEDAおよびbsIgG1-CD3×HER2-LFLEDA）は、低濃度で、ヒトエフェクター細胞（図5A）またはカニクイザルエフェクター細胞（図5B）を使ったAU565細胞の殺滅を誘発した。カニクイザルCD3との交差反応性を示さないCD3二重特異性対照抗体huCLB-T3/4×HER2-LFLEDAは、ヒトPBMCを使用した場合にのみ、AU565細胞の殺滅を誘発した（図5A）。したがって、カニクイザルエフェクター細胞をアッセイに使用した場合には、ターゲット細胞の殺滅は観察されなかった（図5B）。単一特異性IGG1-b12またはIgG1-HER2-LFLEDAまたはbsIgG1-CD3×b12-LFLEDA抗体とのインキュベーションは、ターゲット細胞の非特異的殺滅を誘発しなかった。

【０４２４】
二重特異性抗体変異体bsIgG1 huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA、bsIgG1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA、およびbsIgG1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDAは、ヒトエフェクター細胞（図10A）またはカニクイザルエフェクター細胞（図10B）を使ったAU565細胞の殺滅を、低濃度で誘発した。単一特異性IgG1-b12またはIgG1-HER2-LFLEDA抗体とのインキュベーションは、非特異的ターゲット細胞殺滅を誘導しなかった（図10AおよびB）。このように非活性化Fc領域を含むヒト化CD3変異体は、非特異的ターゲット細胞殺滅を誘発しない。これは、標的T細胞活性化を保証し、よって非標的T細胞活性化を回避するために、非活性化Fc領域を含む変異体を使用できることを示している。

【０４２５】
実施例6：ヒト化CD3抗体変異体によるアカゲザルT細胞の活性化
野生型IgG1 Fc領域を持つヒト化CD3（huCD3）抗体変異体と共にインキュベートした後のT細胞の初期活性化を決定するために、アカゲザルT細胞上のCD69発現を評価した。アカゲザルPBMCの単離と、フローサイトメトリーによるCD69発現の評価は、実施例3で述べたように行った。

【０４２６】
図11は、ヒト化CD3抗体変異体IgG1-huCD3-H1L1、IgG1-huCD3-H1L2、IgG1-huCD3-H1L3、IgG1-huCD3-H3L3、およびIgG1-huCD3-H4L1が、アカゲザル由来のT細胞におけるCD69発現を、IgG1-CD3（実施例1に記載したもの）と同じレベルまで誘発したことを表している。陰性対照抗体IgG1-b12はアカゲザルT細胞におけるCD69の発現を誘発しなかった。したがって本発明のhuCD3変異体は、アカゲザルCD3を使った実験に使用することができる。huCD3変異体はアカゲザルCD3と交差反応する。

【０４２７】
実施例7：huCLB-T3/4の非活性化変異体によるT細胞活性化
Fc領域に変異を持つIgG1-huCLB-T3/4変異体（実施例1参照）と共にインキュベートした後のT細胞の初期活性化を決定するために、T細胞上のCD69発現をFACS解析によって評価した。

【０４２８】
Leucosepチューブ（番号227290;Greiner Bio-one、オランダ国アルフェン・アーン・デン・レイン）を使った密度勾配分離によって全血またはバフィーコートからPBMCを単離し、PBSで洗浄し、培養培地に再懸濁した。

【０４２９】
IgG1-huCLB-T3/4変異体、陰性対照（IgG1-huCLB-T3/4-Fab）および陽性対照（IgE-huCLB-T3/4）の用量応答系列を培養培地に調製し（3倍希釈で1～1,000ng/mLの範囲）、PBMCが入っている96ウェル丸底プレートのウェルに加えた。16～24時間のインキュベーション後に、細胞を遠心分離によってペレット化し、上清（サイトカインを含有している）を収集し、-20℃で保存した。次に、細胞をPBS/0.1%BSA/0.02%アジドで洗浄し、マウス抗ヒトCD28-PE（854.222.010;Sanquin、オランダ国アムステルダム;T細胞マーカー）およびマウス抗ヒトCD69-APC抗体（340560;BD Biosciences、ニュージャージー州フランクリンレイクス）を使って、4℃で30分間染色した。PBS/0.1%BSA/0.02%アジドで2回洗浄することによって未結合の抗体を除去した。細胞を150μL/ウェルに再懸濁し、CD28陽性細胞上のCD69発現をFACS Canto II（BD Biosciences）で測定した。

【０４３０】
図12Aは、IgE-huCLB-T3/4、IgG1-huCLB-T3/4、IgG1-huCLB-T3/4-DAおよびIgG1-huCLB-T3/4-DAPSと共にインキュベートした細胞では、CD69発現量が高かったことを表している。IgG1-huCLB-T3/4-N297Qと共にインキュベートすると、野生型IgG1-huCLB-T3/4と比較していくらか低い発現レベルのCD69が誘導され、IgG1-huCLB-T3/4-LFLEおよびIgG1-huCLB-T3/4-LFLEPSと共にインキュベートした場合のCD69の誘導はさらに低かった。PBMCをIgG1-CD3 Fab、IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA、IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ、IgG1-huCLB-T3/4-DANQおよび

IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS抗体と共にインキュベートしても、T細胞上でのCD69の発現は一切誘発されなかった。

【０４３１】

図12Bは、IgE-huCLB-T3/4およびIgG1-huCLB-T3/4と共にインキュベートした細胞ではCD69発現量が高かったことを表している。IgG1-huCLB-T3/4-LALAと共にインキュベートすると、野生型IgG1-huCLB-T3/4と比較していくらか低い発現レベルのCD69が誘導され、IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDAおよびIgG1-b12（陰性対照）と共にインキュベートしても、T細胞上でのCD69の発現は一切誘発されなかった。

【０４３２】

実施例8：huCLB-T3/4の非活性化変異体によるT細胞増殖

T細胞の増殖に対するhuCLB-T3/4変異体（実施例1に記載したもの）の効果を、Roche Applied Scienceの細胞増殖ELISAキット（Cell Proliferation ELISA, BrdUキット、番号11647229001;Roche Applied Science、ドイツ国マンハイム）によって評価した。評価は製造者の説明書に従って行った。

【０４３３】

全血またはバフィーコートから単離したPBMCを、96ウェル培養プレート中で、IgG1-CD3変異体の希釈系列（0.1～1,000ng/mLの範囲）と共にインキュベートした。IgE-CD3およびIgG1-CD3を陽性対照として含め、IgG1-b12（二重特異性抗体を作製するためのK409R変異を持つもの）を陰性対照として含めた。抗体と共に3日間インキュベートした後、BrdU（Roche Applied Science、ドイツ国マンハイム）を培地に加え、プレートを5時間インキュベートした。次に、細胞を遠心分離によってペレット化し、上清を収集し、-20℃で保存した。プレートを乾燥し、ELISAを行うまで4℃で保存した。

【０４３４】

DNAへのBrdUの取り込みは、製造者の説明書（Cell Proliferation ELISA, BrdUキット、番号11647229001;Roche Applied Science）に従ってELISAによって決定した。細胞をプレートに固定した後、ペルオキシダーゼとコンジュゲートされた抗BrdU抗体と共に、プレートを室温（RT）で90分間インキュベートした。プレートをPBSTで洗浄し、（キットと共に提供されるTMB溶液ではなく）ABTS緩衝液を使って、結合を検出した。30分後にウェルに2%シュウ酸を加えることによって発色を停止した。次にEL808 ELISAリーダーでOD405nmを測定した。

【０４３５】

図13Aは、PBMCをIgG1-huCLB-T3/4、IgG1-huCLB-T3/4-DAおよびIgG1-huCLB-T3/4-DAPSと共にインキュベートすると、極めて低い抗体濃度でさえ、強いT細胞増殖が誘発されたことを表している。IgG1-huCLB-T3/4-N297Qとのインキュベーションは、IgE-huCLB-T3/4陽性対照に匹敵する用量依存的増殖を誘発した。PBMCをIgG1-huCLB-T3/4-Fab、IgG1-b12-N297Q、IgG1-huCLB-T3/4-LFLE、IgG1-huCLB-T3/4-LFLEDA、IgG1-huCLB-T3/4-LFLENQ、IgG1-huCLB-T3/4-LFLEPS、IgG1-huCLB-T3/4-DANQおよびIgG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS抗体と共にインキュベートしても、T細胞の増殖は誘発されなかった。

【０４３６】

図13Bは、PBMCをIgG1-huCLB-T3/4と共にインキュベートすると、極めて低い抗体濃度でさえ、強いT細胞増殖が誘発されたことを表している。IgE-huCLB-T3/4（陽性対照）およびIgG1-huCLB-T3/4-LALAとのインキュベーションは、用量依存的増殖を誘発した。PBMCをIgG1-huCLB-T3/4-LFLEDAと共にインキュベートしても、T細胞の増殖は誘発されなかった。

【０４３７】

実施例7および8の結果に基づいて、活性化の程度が最も小さいと考えられるミュータントの部分集合を、さらなる解析に付した。

【０４３８】

実施例9：非活性化抗体変異体huCLB-T3/4によって誘発されるインビトロT細胞媒介性細胞傷害

10％（vol/vol）熱失活CCS、1.5g/L炭酸水素ナトリウム（Lonza）、1mMピルビン酸ナトリウム、4.5g/Lグルコース（Sigma）、50IU/mLペニシリン、および50μg/mLストレプトマイシンを補足したRPMI1640中でAU565（ヒト乳癌）細胞を培養した。細胞株を5％（vol/vol）CO_2湿潤インキュベータ中で37℃に維持した。AU565細胞をほぼコンフルエントまで培養した。細胞をトリプシン処理し、培養培地中に再懸濁し、セルストレーナーに通すことで、単細胞懸濁液を得た。96ウェル培養プレートの各ウェルに5×10^4細胞を播種し、細胞を37℃、5％CO2で少なくとも3時間インキュベートすることで、プレートに接着させた。

【０４３９】

末梢血単核球（PBMC）を、健常ボランティアの血液から、Leucosep 30mLチューブを使用し、製造者のプロトコール（Greiner Bio-one）に従って単離した。単離されたPBMCをPBSで洗浄し、培養培地中に再懸濁し、96ウェルプレート中のAU565腫瘍細胞に1：1の比で加えた。マウス抗ヒトCD3-PerCP（BD、番号345766）抗体（T細胞染色用）を使って、FACS解析により、PBMC中に存在するT細胞のパーセンテージを測定した。使用したPBMC集団中のT細胞含量は典型的には50～60％であった。

【０４４０】

異なるFc変異体、野生型、N297Q、LFLE、LALA、LFLENQ、LFLEDA、DANQ、およびLFLEDENQPSとして発現させたIgG1-b12、IgG1-huCLB-T3/4、IgG1-HER2、および二重特異性huCLB-T3/4×b12およびhuCLB-T3/4×HER2抗体の希釈系列（0.004ng/mLから1000ng/mLまでの範囲の最終濃度）を培養培地中に調製し、プレートに加えた。プレートを37℃、5％CO_2で3日間インキュベートした。100％腫瘍細胞殺滅の基準として、細胞を1μMスタウロスポリン（番号S6942-200、Sigma）と共にインキュベートした。

【０４４１】

インキュベーション後に、上清を取り出し、-20℃で保存した。プレートをPBSで2回洗浄し、10％アラマーブルーを含有する150μLの培養培地を各ウェルに加えた。プレートを37℃、5％CO_2で4時間インキュベートした。590nmにおける吸光度を測定した（Envision、Perkin Elmer、マサチューセッツ州ウォルサム）。

【０４４２】

異なるドナーからのPBMCを使って2回の実験を行った。第1の実験では、Fc変異体N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DANQ、およびLFLEDANQPSを試験した（図14A～G）。第2の実験では、Fc変異体LFLEDAおよびLALAを試験した（図15A～C）。どちらの実験にも参照として野生型Fcドメインを持つ抗体を含めた。野生型単一特異性IgG1-huCLB-T3/4または二重特異性huCLB-T3/4×b12抗体とのインキュベーションは、ターゲット細胞の非特異的殺滅を誘発した（図14A～Gおよび15A～C）。単一特異性IgG1-huCLB-T3/4ならびにbsIgG1-huCLB-T3/4×b12変異体N297Q（図14A～G）およびLALA（図15A～C）は依然として多少の非特異的ターゲット細胞殺滅を誘発したが、同じ実験で試験した野生型抗体と比べると、その程度は低かった。非活性化変異を持つ試験した他のIgG1-huCLB-T3/4またはbsIgG1-huCLB-T3/4×b12抗体のいずれでも、非特異的ターゲット細胞殺滅は誘発されなかった（図14A～Gおよび15A～C）。

【０４４３】

全ての二重特異性huCLB-T3/4×HER2抗体が、AU565細胞の用量依存的殺滅を、非活性化変異を持たない野生型二重特異性huCLB-T3/4×HER2抗体と比較して少なくとも匹敵する効力で誘発した（図14A～Gおよび15A～C）。最大殺滅は極めて低い濃度で起こった。

【０４４４】

単一特異性b12またはHER2抗体の野生型または非活性化変異体では、細胞傷害は誘発されず（図14A～Gおよび15A～C）、それは予期したとおりであった。

【０４４５】

実施例10：huCLB-T3/4の非活性化抗体変異体に対するC1qの結合の評価

C1qとターゲット細胞に結合した抗体との相互作用は、補体活性化の古典経路における第1段階である。野生型IgG1はC1qに対する相互作用部位を内包しているので、ELISAによるこれらの非活性化IgG1変異体に対するC1qの相互作用を評価した。

【０４４６】
IgG1-huCLB-T3/4、bsIgG1-huCLB-T3/4×HER2およびIgG1-CD20（陽性対照）ならびに上記実施例1で述べたその非活性化抗体変異体の希釈系列（4倍希釈で7～30,000ng/mLの範囲）を、96ウェルMicrolon ELISAプレート（ドイツ国グライナー）に、4℃で終夜コーティングした。プレートを洗浄し、0.025％Tween 20および0.1％ゼラチンを補足したPBSでブロッキングした。インキュベーション間に洗浄しながら、プレートを、3％プールヒト血清（Sanquin、製品番号M0008）と共に37℃で1時間、100μL/ウェルのウサギ抗ヒトC1q（DAKO、製品番号A0136、1/4,000）と共に室温で1時間、そして検出抗体としての100μL/ウェルのブタ抗ウサギIgG-HRP（DAKO、P0399、1：10,000）と共に室温で1時間、逐次インキュベートした。検出は、約30分間、1mg/mLの2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS;Roche、ドイツ国マンハイム）を添加することによって行った。100μLの2％シュウ酸を添加することによって反応を停止した。マイクロプレートリーダー（Biotek、バーモント州ウィヌースキ）で405nmにおける吸光度を測定した。対数変換したデータをGraphPad Prismソフトウェアを使って傾き可変のシグモイド用量応答曲線に当てはめることによって解析した。

【０４４７】
図16Aは、野生型IgG1 Fc領域を持つ抗体IgG1-CD20およびIgG1-huCLB-T3/4がC1q結合を示したことを表している。評価した非活性化変異（N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DA、DAPS、DANQ、LFLEPS、LFLEDANQPS、LALA）を持つ抗体変異体ではいずれも、C1qの結合が検出されなかった。

【０４４８】
図16Bは、野生型IgG1 Fc領域を持つ抗体bsIgG1-huCLB-T3/4×HER2がC1q結合を示したことを表している。評価した非活性化変異（N297Q、LFLE、LFLENQ、LFLEDA、DA、DAPS、DANQ、LFLEPS、LFLEDANQPS、LALA）を持つ抗体変異体ではいずれも、C1qの結合が検出されなかった。

【０４４９】
図16Cおよび図16Dは、野生型IgG1 Fc領域を持つ抗体IgG1-CD20、IgG1-huCLB-T3/4、およびbsIgG1-huCLB-T3/4×HER2がC1q結合を示したことを表している。非活性化変異（LFLEDAおよびLALA）を持つ抗体変異体ではC1qの結合が検出されなかった。

【０４５０】
実施例11：非活性化抗体変異体の薬物動態（PK）解析
この研究ではマウスをCentral Laboratory Animal Facility（オランダ国ユトレヒト）のバリアユニット（barrier unit）で飼育し、フィルタトップケージに入れて水および食物を自由摂取させた。実験は全てユトレヒト大学動物倫理委員会の承認を受けた。1群あたり3匹のマウスを使って、7～10週齢のC.B-17SCIDマウス（C.B-17/Icr-Prkdc<Scid>/IcrIcoCrl、Charles-River）に、100μgの野生型抗体（IgG1-huCLB-T3/4、IgG1-HER2、またはbsIgG-huCLB-T3/4×HER2）またはその非活性化変異体（LALA、LFLEDA、LFLENQ、DANQまたはLFLEDANQPS）を静脈内注射した。抗体投与の10分、4時間、1日、2日、7日、14日および21日後に伏在静脈から50μLの血液試料を収集した。血液はヘパリン含有バイアル中に収集し、10,000×gで5分間遠心分離した。抗体濃度を決定するまで、血漿を-20℃で保存した。

【０４５１】
総hIgGサンドイッチELISAを使ってヒトIgG濃度を決定した。このアッセイのために、96ウェルMicrolon ELISAプレート（Greiner、ドイツ）に2μg/mLの濃度でコーティングしたマウスmAb抗ヒトIgG-カッパクローンMH16（番号M1268、CLB Sanquin、オランダ）を捕捉抗体として使用した。0.2％ウシ血清アルブミンを補足したPBSでプレートをブロッキングした後、ELISA緩衝液（0.05％Tween 20および0.2％ウシ血清アルブミンを補足したPBS）で連続希釈した試料を加え、プレート振とう器上、室温（RT）で1時間インキュベートした。次にプレートをヤギ抗ヒトIgG免疫グロブリン（番号109-035-098、Jackson、ペンシルベニア州ウエストグレース）と共にインキュベートし、2,2'-アジノ-ビス（3-エチルベ

ンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（ABTS;Roche、ドイツ国マンハイム）で発色させた。ウェルに2％シュウ酸を加えることによって反応を30分後に停止した。マイクロプレートリーダー（Biotek、バーモント州ウィヌースキ）で405nmにおける吸光度を測定した。

【０４５２】

血漿クリアランス率（mL/日/kg）は、以下の等式に従い、曲線下面積（AUC）に基づいて計算した。

$$\text{血漿クリアランス} = \frac{\text{用量}\ (\mu g/kg)}{AUC\ (\mu g/mL/日)}$$

【０４５３】

データ解析はGraphpad prismソフトウェアを使って行った。

【０４５４】

図17Aは、野生型抗体と比べると抗体変異体N297Q、DANQ、LFLENQ、およびLFLEDANQPSの方が血漿中ヒトIgG濃度が低く、より迅速なクリアランスが示唆されたことを表している。抗体変異体LFLEDAおよびLALAについては血漿中のヒトIgG濃度が野生型抗体と類似していた。

【０４５５】

図17Bは、抗体変異体N297Q、DANQおよびLFLENQの血漿クリアランス率が野生型抗体のクリアランス率より2～3倍高かったことを表している。抗体変異体LFLEDANQPSのクリアランス率は野生型抗体のクリアランス率より3～5倍高かった。抗体変異体LFLEDAおよびLALAの血漿クリアランス率は野生型抗体のクリアランス率と類似していた。

【０４５６】

実施例12：IgG1-LFLEDAバックボーンのインビトロ免疫原性評価

IgG1-LFLEDA-K409Rバックボーンの臨床的免疫原性の潜在力を決定するために、AntitopeのEpiScreen（商標）プラットフォームをIgG1-HER2-LFLEDAに応用した。簡単に述べると、欧州および北アメリカの母集団を代表する50人のHLA型判定した健常ドナーのコホートから、PBMCを単離した。CD8+ T細胞枯渇後に、PBMC調製物を個別に凍結し保存した。次に、融解したPBMCを培養し、IgG1-HER2-LFLEDA-K409Rまたは対照試料の一つ（IgG1-HER2またはIgG1-HER2-LFLE-K409R）と共に5～8日間培養した。CD4+ T細胞応答を誘発する試料の能力を、細胞増殖（［3^H］-チミジン取り込み）およびIL-2生産（ELISpotアッセイ）によって評価した。どちらのアッセイでも刺激指数（SI;シグナル/ベースラインシグナル）≧1.9の応答を示したドナーを陽性とみなした。

【０４５７】

EpiScreen（商標）解析により、IgG1-HER2-LFLEDAの場合は4人のドナー（8％）が陽性CD4+ T細胞応答を示し、これはIgG1-HER2およびIgG1-HER2-LFLEに関するそれぞれ4例（8％）および3例（6％）の陽性応答に匹敵することがわかった（図18）。したがってIgG1-HER2-LFLEDA-K409R（ならびにIgG1-HER2およびIgG1-HER2-LFLE-K409R）は、免疫原性に関して低い潜在力を示し、応答頻度は10％未満であった。陽性対照ヒト化A33（例えば［84］）を臨床的ベンチマーク対照抗体として使用した。このヒト化A33は、臨床では高レベルの免疫原性を示し、EpiScreenアッセイでは通例、20～30％のT細胞応答を誘発する。

【０４５８】

参考文献一覧

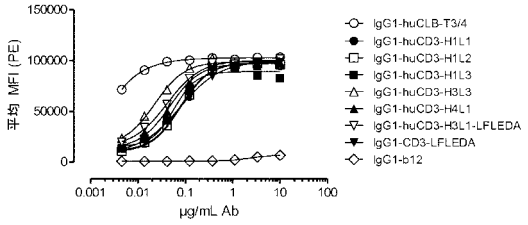
[1] Xu *et al.*, 2000, Cell Immunol. 200(1):16-26
[2] Herold *et al.*, 2005, Diabetes, 54(6):1763-9
[3] Staerz, *et.al.*, 1985, Nature 314:628-631
[4] Muller and Kontermann, 2010, BioDrugs 24: 89-98
[5] Lum and Thakur, 2011, BioDrugs 25: 365-379
[6] Linke *et al.*, 2010, MAbs 2: 129-136
[7] Ruf *et al.*, 2010, Br J Clin Pharmacol 69: 617-625
[8] Bokemeyer *et al.*, 2009, J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 3036
[9] Heiss *et al.*, 2010, Int J Cancer 127: 2209-2221
[10] Jones *et al.*, 2009, Lancet Oncol 10:1179-1187
[11] Kiewe *et al.*, 2006, Clin Cancer Res 12:3085-3091
[12] WO 2012/162067
[13] WO 2008/119567
[14] Fundamental Immunology Ch. 7, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)
[15] Lefranc MP, *et al.*, 2003, Dev Comp Immunol. Jan;27(1):55-77
[16] Brochet, X. *et al.*, 2008, Nucl.Acids Res. 36, W503-508
[17] Giudicelli, V., Brochet, X, Lefranc, M.-P., 2011, Cold Spring Harb Protoc. Jun 1;2011(6)
[18] Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15
[19] WO92/22653
[20] EP 0 629 240
[21] E. Meyers and W. Miller, 1988, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17
[22] Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 444-453
[23] Clustal W algorithm, Thompson, 1994
[24] T cell Epitope Database from e.g. http://www.iedb.org/
[25] Perry *et al.*, 2008 Drugs R D 9 (6):385-396

[26] Bryson *et al.*, 2010, Biodrugs 24 (1):1-8
[27] Kabat, E.A. *et al.*, 1991, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689
[28] Oganesyan *et al.*, 2008, Acta Cryst. (D64):700-4
[29] Canfield *et al.*, 1991, J. Exp.Med. (173):1483-91
[30] Duncan *et al.*, 1988, Nature (332):738-40
[31] Shields *et al.*, 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604
[32] Idusogie EE, *et al.*, 2000, J Immunol. 164: 4178-84
[33] Leabman *et al.*, 2013, MAbs; 5(6):896-903
[34] Parren *et al.*, 1992, J. Clin Invest. 90: 1537-1546
[35] Bruhns *et al*,. 2009, Blood 113: 3716-3725
[36] WO 2011/066501
[37] Lightle, S., *et al.*, 2010, Protein Science (19):753-62
[38] Brekke *et al.*, 2006, J Immunol 177:1129-1138
[39] Dall'Acqua WF, *et al.*, 2006, J Immunol 177:1129-1138
[40] Wu *et al.*, 2010, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg
[41] WO 2011/131746
[42] WO 2002/020039
[43] WO 98/050431
[44] WO 2011/117329
[45] EP 1 870 459
[46] WO 2009/089004
[47] US 2010 00155133
[48] WO 2010/129304
[49] WO 2007/110205
[50] WO 2010/015792
[51] WO 2011/143545
[52] WO 2012/058768
[53] WO 2011/028952
[54] WO 2008/003116
[55] US 7,262,028
[56] US 7,612,181
[57] WO 2010/0226923
[58] US 7,951,918

[59] CN 102250246
[60] WO 2012/025525
[61] WO 2012/025530
[62] WO 2008/157379
[63] WO 2010/080538
[64] Sykes and Johnston, 1997, Nat Biotech 17, 355-59
[65] US 6,077,835
[66] WO 2000/70087
[67] Schakowski *et al.*, 2001, Mol Ther 3, 793-800
[68] WO 2000/46147
[69] Benvenisty and Reshef, 1986, PNAS USA 83, 9551-55
[70] Wigler *et al.*, 1978, Cell 14, 725
[71] Coraro and Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7, 603
[72] US 5,589,466
[73] US 5,973,972
[74] Van Heeke & Schuster, 1989, J Biol Chem 264, 5503-5509
[75] F. Ausubel *et al.*, 1987, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York
[76] Grant *et al.*, 1987, Methods in Enzymol 153, 516-544
[77] Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995
[78] Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
[79] Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy, Plenum Press 1988
[80] Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-652, Mack Publishing Co., 1990
[81] Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.), Chapman & Hall 1993
[82] US 5,057,313
[83] US 6,331,175
[84] Ritter G, *et al.*; 2001, Cancer Res., 61:6851-9

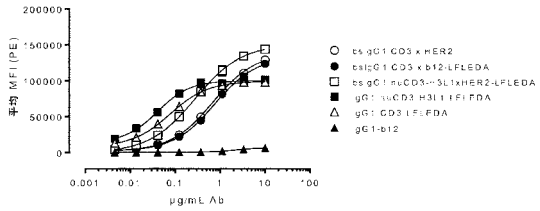
【図１】

A



抗体	EC50 (μg/mL)
IgG1-huCD3-H1L1	0.07
IgG1-huCD3-H1L2	0.08
IgG1-huCD3-H1L3	0.06
IgG1-huCD3-H3L3	0.02
IgG1-huCD3-H4L1	0.05
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.08

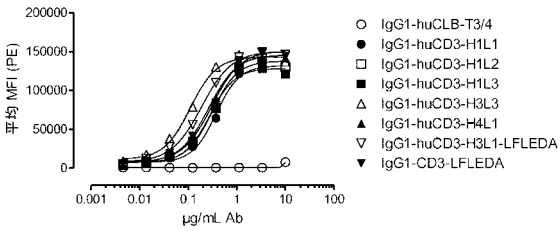
B



抗体	EC50 (μg/mL)
bsIgG1 CD3 x HER2	0.68
bsIgG1 CD3 x b12-LFLEDA	0.75
bsIgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.28
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.07

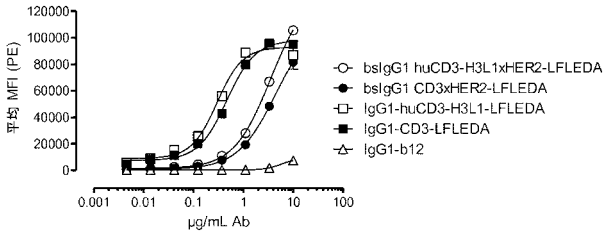
【図２】

A



抗体	EC50 (μg/mL)
IgG1-huCD3-H1L1	0.37
IgG1-huCD3-H1L2	0.31
IgG1-huCD3-H1L3	0.28
IgG1-huCD3-H3L3	0.11
IgG1-huCD3-H4L1	0.26
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.19
IgG1-CD3-LFLEDA	0.30

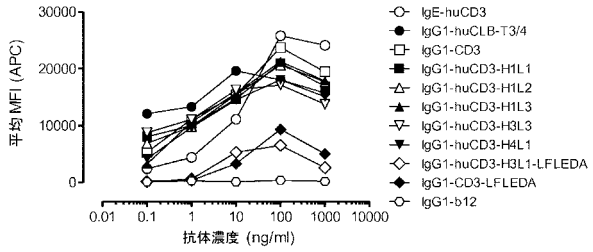
B



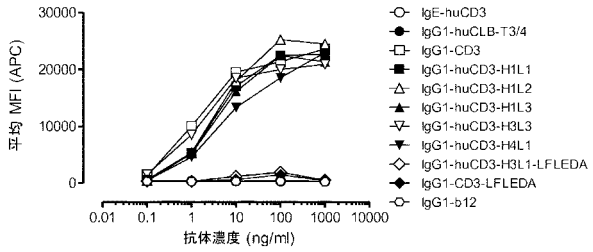
抗体	EC50 (μg/mL)
bsIgG1 CD3xHER2-LFLEDA	4.46
bsIgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	3.54
IgG1-CD3-LFLEDA	0.47
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.30

【図３】

A

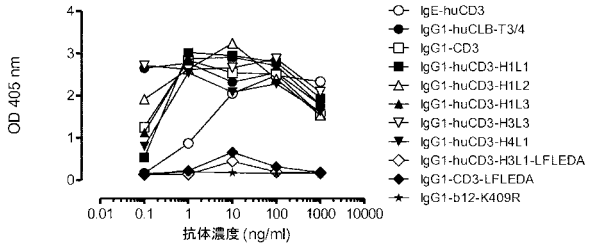


B

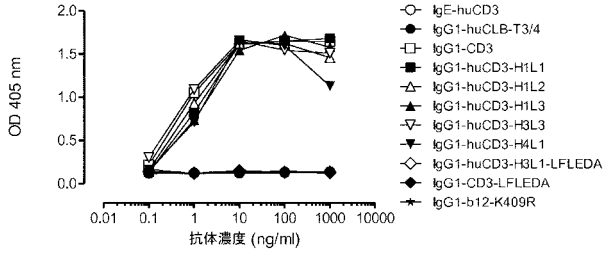


【図４】

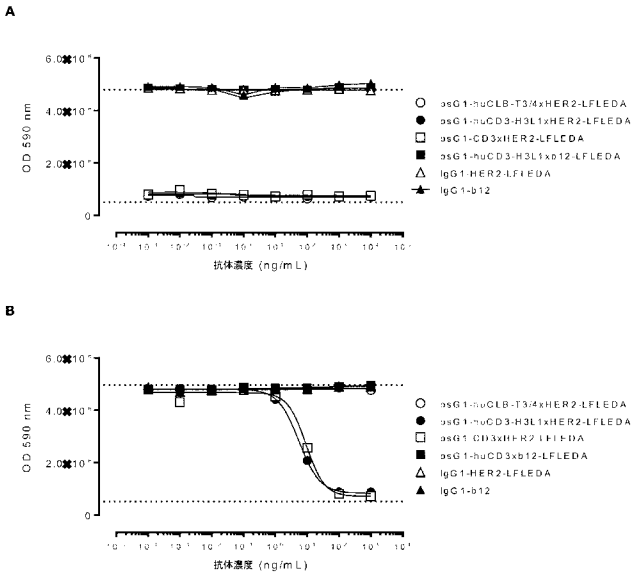
A



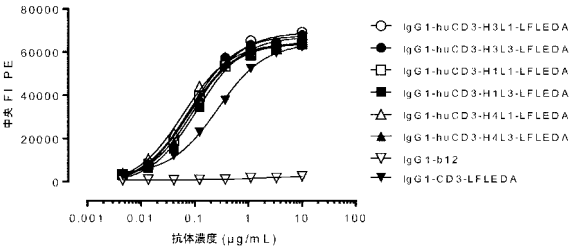
B



【図５】

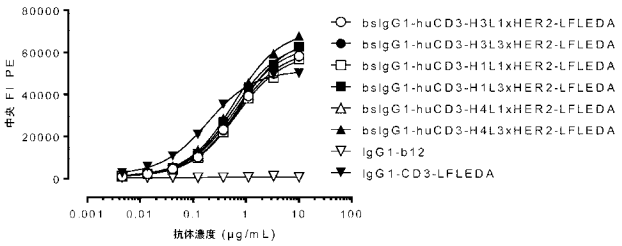


【図６Ａ】



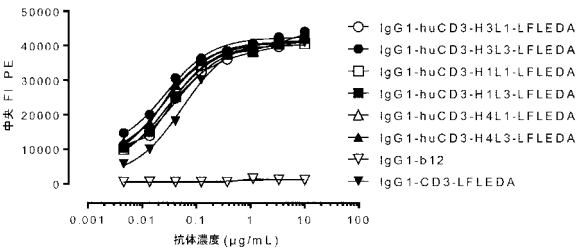
抗体	EC50 (μg/mL)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.10
IgG1-huCD3-H3L3- LFLEDA	0.08
IgG1-3huCD3-H1L1- LFLEDA	0.08
IgG1-huCD3-H1L3- LFLEDA	0.11
IgG1-huCD3-H4L1- LFLEDA	0.06
IgG1-huCD3-H4L3- LFLEDA	0.08
IgG1-CD3-LFLEDA	0.27

【図６Ｂ】



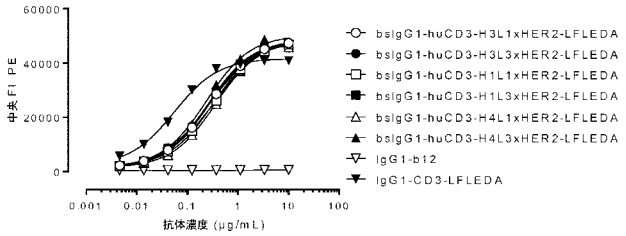
抗体	EC50 (μg/mL)
bsIgG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.64
bsIgG1-huCD3-H3L3xHER2-LFLEDA	0.74
bsIgG1-huCD3-H1L1xHER2-LFLEDA	0.66
bsIgG1-huCD3-H1L3xHER2-LFLEDA	0.58
bsIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.62
bsIgG1-huCD3-H4L3xHER2-LFLEDA	0.59
IgG1-CD3-LFLEDA	0.18

【図７Ａ】



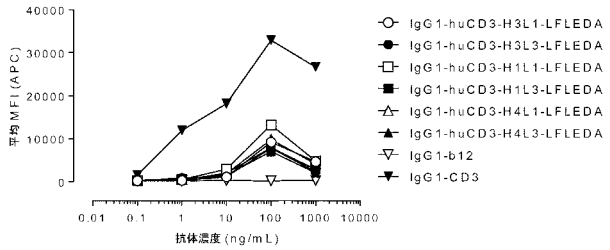
抗体	EC50 (μg/mL)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA	0.02
IgG1-CD3-LFLEDA	0.06

【図７Ｂ】

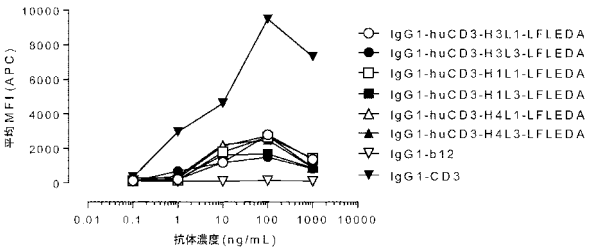


抗体	EC50 (μg/mL)
bsIgG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.28
bsIgG1-huCD3-H3L3xHER2-LFLEDA	0.26
bsIgG1-huCD3-H1L1xHER2-LFLEDA	0.32
bsIgG1-huCD3-H1L3xHER2-LFLEDA	0.25
bsIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.36
bsIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.24
IgG1-CD3-LFLEDA	0.06

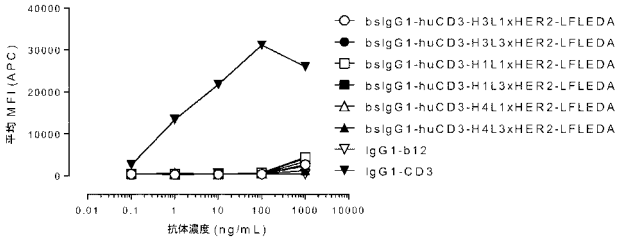
【図８Ａ】



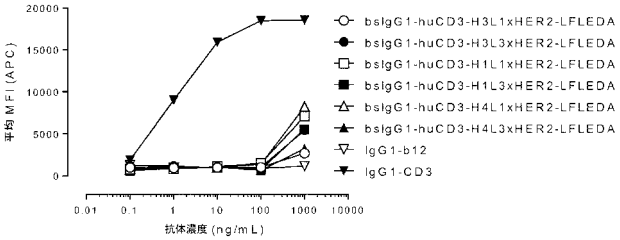
【図８Ｂ】



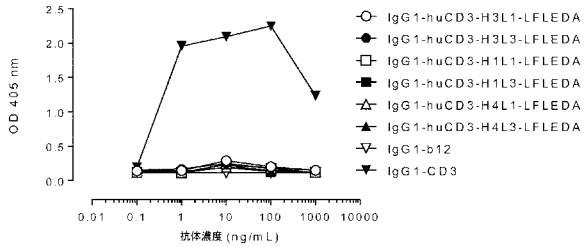
【図８Ｃ】



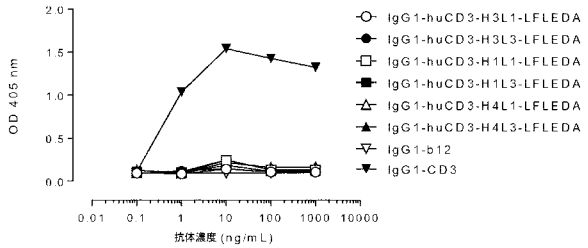
【図８Ｄ】



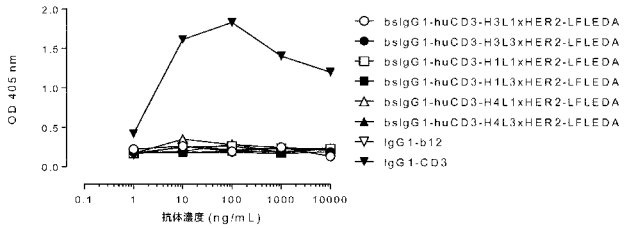
【図９Ａ】



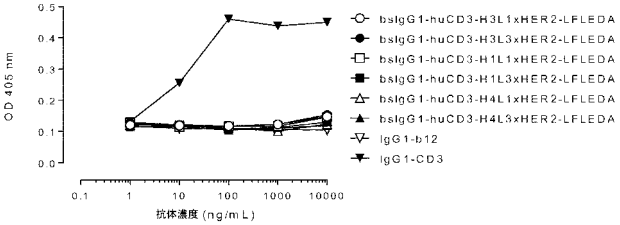
【図９Ｂ】



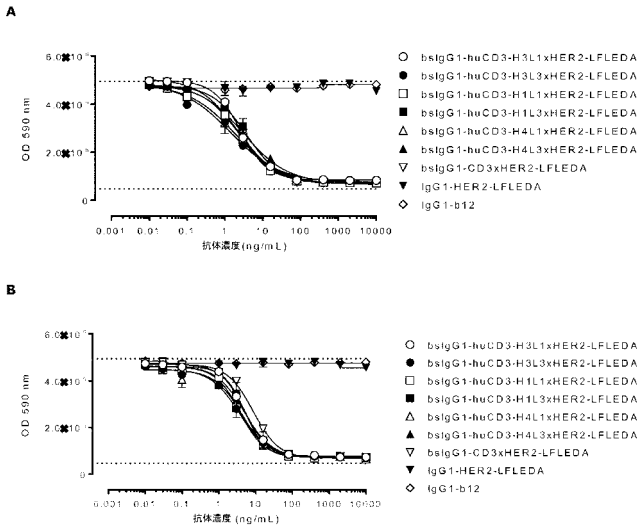
【図９Ｃ】



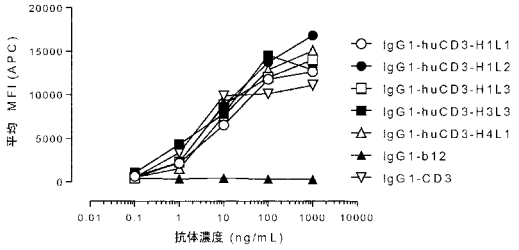
【図９Ｄ】



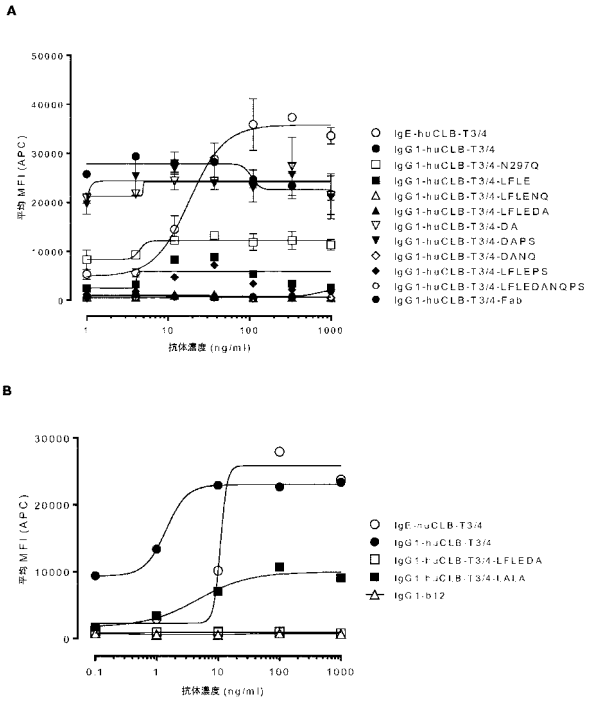
【図１０】



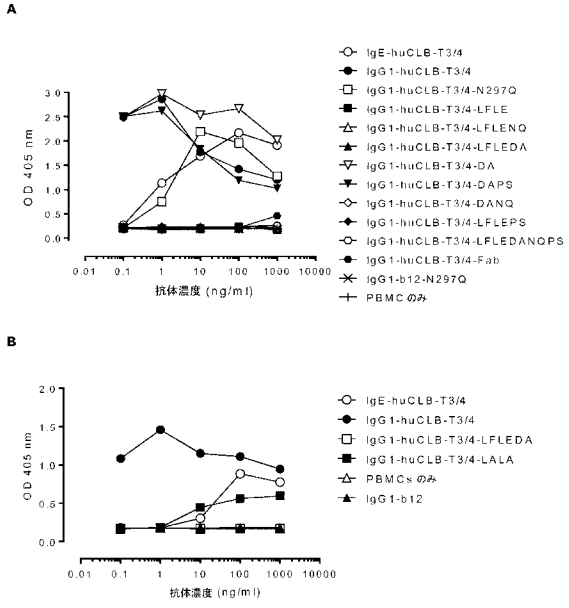
【図１１】



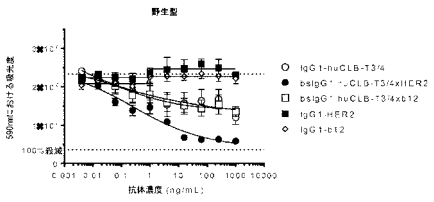
【図１２】



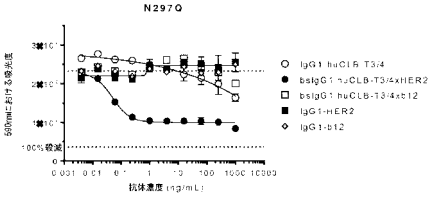
【図１３】



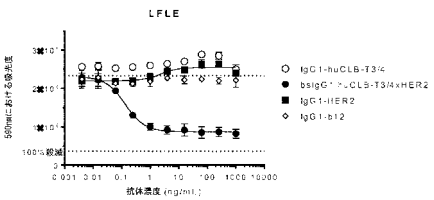
【図１４Ａ】



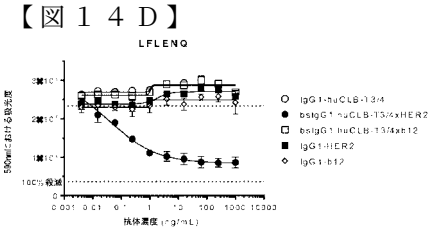
【図１４Ｂ】



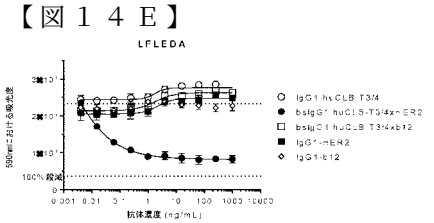
【図１４Ｃ】



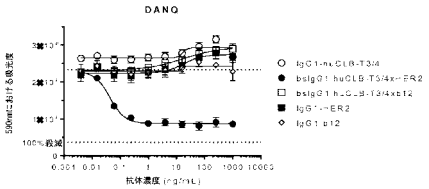
【図１４Ｄ】



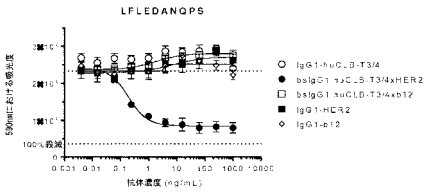
【図１４Ｅ】



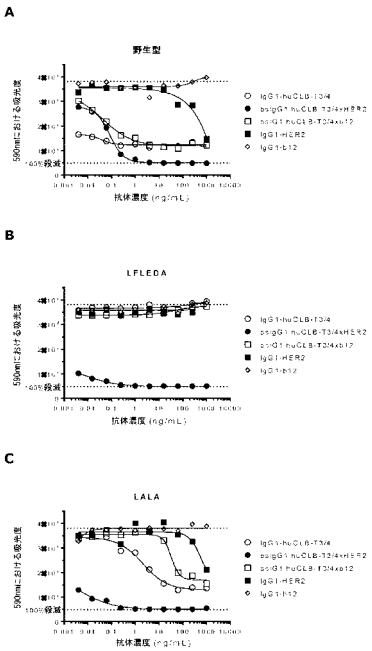
【図１４Ｆ】



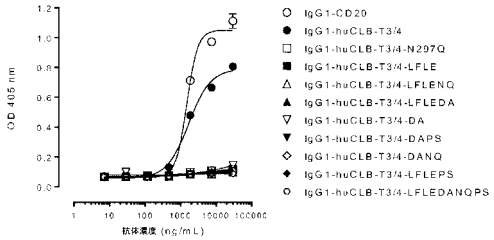
【図１４Ｇ】



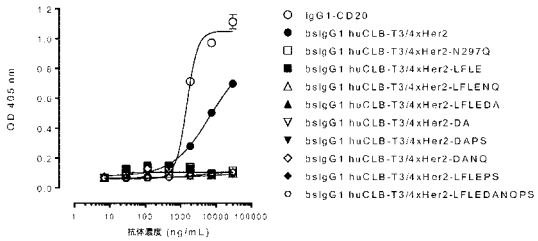
【図１５】



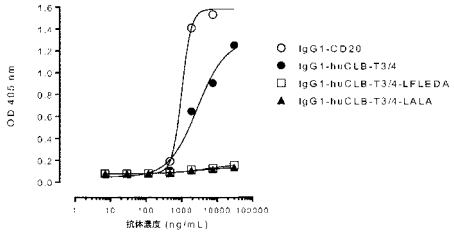
【図１６Ａ】



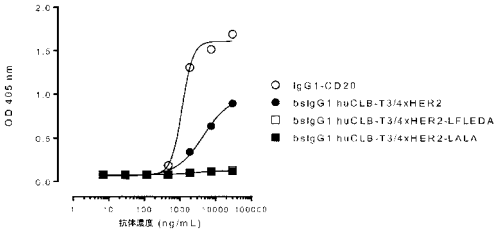
【図１６Ｂ】



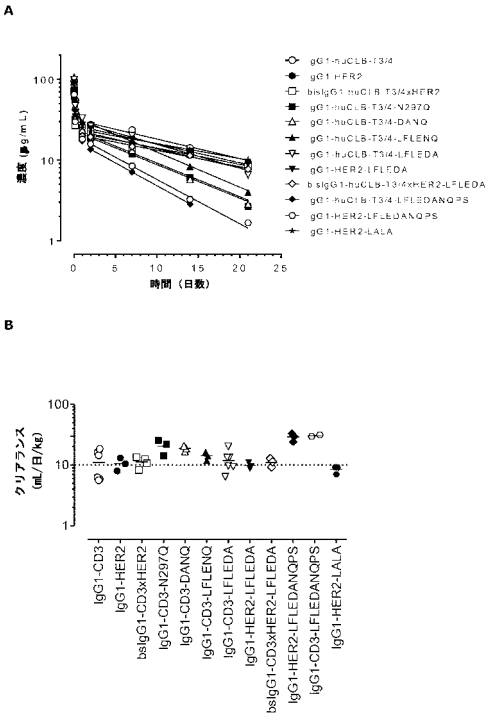
【図１６Ｃ】



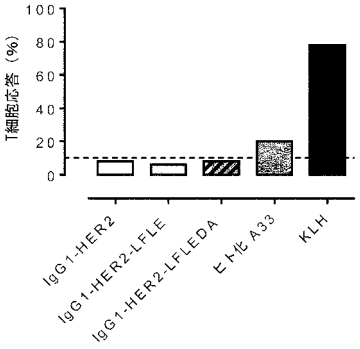
【図１６Ｄ】



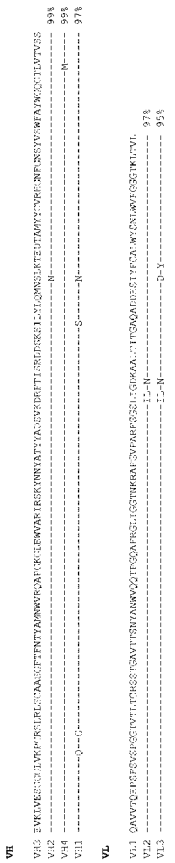
【図１７】


A
濃度（μg/mL）
時間（日数）
gG1-huCLB-T3/4
gG1-HER2
bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2
gG1-huCLB-T3/4-N297Q
gG1-huCLB-T3/4-DANQ
gG1-huCLB-T3/4-LFLENQ
gG1-huCLB-T3/4-LFLEDA
gG1-HER2-LFLEDA
bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2-LFLEDA
gG1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS
gG1-HER2-LFLEDANQPS
gG1-HER2-LALA
B
クリアランス（mL/日/kg）
IgG1-CD3
IgG1-HER2
bsIgG1-CD3xHER2
IgG1-CD3-N297Q
IgG1-CD3-DANQ
IgG1-CD3-LFLENQ
IgG1-CD3-LFLEDA
IgG1-HER2-LFLEDA
bsIgG1-CD3xHER2-LFLEDA
IgG1-HER2-LFLEDANQPS
IgG1-CD3-LFLEDANQPS
IgG1-HER2-LALA

【図１８】


T細胞応答（%）
IgG1-HER2
IgG1-HER2-LFLE
IgG1-HER2-LFLEDA
ヒトβA33
KLH

【図１９】


VH
VL

【配列表】
2020005635000001.app
【手続補正書】
【提出日】令和1年7月18日(2019.7.18)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
それぞれSEQ ID NO：1、2、および3に示す配列を有する重鎖可変（VH）領域CDR1、CDR2、およびCDR3と、それぞれSEQ ID NO：4に示す配列、配列GTN、およびSEQ ID NO：5に示す配列を有する軽鎖可変（VL）領域CDR1、CDR2、およびCDR3とを含む結合領域を含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体。
【請求項２】
VH領域が、
（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列、
（c）SEQ ID NO：7に示すVH配列、および
（d）SEQ ID NO：9に示すVH配列
からなる群より選択されるVH配列に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1記載の抗体。
【請求項３】
VL領域が、
（a）SEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：11に示すVL配列、および
（c）SEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択されるVL配列に示すアミノ酸配列に対して少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または少なくとも99％のアミノ酸配列同一性を有する、請求項1または2記載の抗体。
【請求項４】
VH領域が、
（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列、
（c）SEQ ID NO：7に示すVH配列、および
（d）SEQ ID NO：9に示すVH配列
からなる群より選択される、請求項1～3のいずれか一項記載の抗体。
【請求項５】
VL領域が、
（a）SEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：11に示すVL配列、および
（c）SEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択される、請求項1～4のいずれか一項記載の抗体。
【請求項６】
VH領域およびVL領域が、
（a）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（b）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（c）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、

（d）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、
（e）SEQ ID NO：6に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列、
（f）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：10に示すVL配列、
（g）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、
（h）SEQ ID NO：7に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列、
（i）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、
（j）SEQ ID NO：8に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列、
（k）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：11に示すVL配列、ならびに
（l）SEQ ID NO：9に示すVH配列およびSEQ ID NO：12に示すVL配列
からなる群より選択される、請求項1～5のいずれか一項記載の抗体。

【請求項７】
ヒト化抗体である、請求項1～6のいずれか一項記載の抗体。

【請求項８】
全長抗体である、請求項1～7のいずれか一項記載の抗体。

【請求項９】
第1および第2免疫グロブリン重鎖を含むFc領域を含む、請求項1～8のいずれか一項記載の抗体。

【請求項１０】
第1および第2重鎖が、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプのものである、請求項1～9のいずれか一項記載の抗体。

【請求項１１】
抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも95％、少なくとも97％、または100％低減するように修飾されたFc領域を含み、
C1q結合がELISAによって決定される、
請求項1～10のいずれか一項記載の抗体。

【請求項１２】
野生型抗体と比較して前記抗体が少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように修飾されたFc領域を含み、
該T細胞増殖が末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイにおいて測定される、
請求項1～11のいずれか一項記載の抗体。

【請求項１３】
野生型抗体と比較した場合に、前記抗体がFc媒介CD69発現を少なくとも50％、少なくとも60％、少なくとも70％、少なくとも80％、少なくとも90％、少なくとも99％、または100％低減するように修飾されたFc領域を含み、
Fc媒介CD69発現がPBMCに基づく機能アッセイにおいて決定される、
請求項1～12のいずれか一項記載の抗体。

【請求項１４】
第1および第2免疫グロブリン重鎖を含み、
該第1および該第2免疫グロブリン重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置にある1つまたは複数のアミノ酸が、それぞれL、L、D、N、およびPではない、
請求項1～13のいずれか一項記載の抗体。

【請求項１５】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれLおよびLではない、請求項14記載の抗体。

【請求項１６】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれFおよびEであるか、またはAおよびAである、請求項14

および15のいずれか一項記載の抗体。
【請求項１７】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれF、E、およびAであるか、またはA、A、およびAである、請求項1～14のいずれか一項記載の抗体。
【請求項１８】
第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれF、E、およびAである、請求項17記載の抗体。
【請求項１９】
請求項1～10のいずれか一項に記載の抗体の第1結合領域と、該第1抗原結合領域とは異なるターゲットに結合する第2結合領域とを含む、二重特異性抗体。
【請求項２０】
第1および第2重鎖を含む、請求項19記載の二重特異性抗体。
【請求項２１】
（a）二重特異性抗体が、請求項11～13のいずれか一項に従って修飾されたFc領域を含むか、または
（b）第1および第2重鎖の少なくとも一方が、請求項14～18のいずれか一項に記載するように修飾された1つまたは複数のアミノ酸を含む、
請求項20記載の二重特異性抗体。
【請求項２２】
第1および第2重鎖のそれぞれが、少なくともヒンジ領域、CH2およびCH3領域を含み、該第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも1つが置換されており、該第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖中のT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸の少なくとも1つが置換されており、該第1および該第2重鎖が同じ位置では置換されていない、請求項19～21のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項２３】
ヒトIgG1重鎖中のF405に対応する位置のアミノ酸が第1重鎖ではLであり、かつヒトIgG1重鎖中のK409に対応する位置のアミノ酸が第2重鎖ではRであるか、またはその逆である、請求項22記載の二重特異性抗体。
【請求項２４】
第1結合領域が請求項1～6のいずれか一項に従い、第2結合領域が該第1結合領域とは異なるターゲットに結合する、請求項19～23のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項２５】
表1に示す1つまたは複数のアミノ酸配列をコードする、核酸コンストラクト。
【請求項２６】
（i）請求項1～24のいずれか一項記載のヒト化抗体もしくはキメラ抗体の重鎖配列をコードする核酸配列、
（ii）請求項1～24のいずれか一項記載のヒト化抗体もしくはキメラ抗体の軽鎖配列をコードする核酸配列、または
（iii）（i）と（ii）の両方
を含む発現ベクター。
【請求項２７】
請求項26記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。
【請求項２８】
組換え真核宿主細胞、組換え原核宿主細胞、または組換え微生物宿主細胞である、請求項27記載の宿主細胞。
【請求項２９】

請求項1～18のいずれか一項記載の抗体または請求項19～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体を含む、組成物。
【請求項３０】
請求項1～18のいずれか一項記載の抗体または請求項19～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。
【請求項３１】
医薬として使用するための、請求項1～18のいずれか一項記載の抗体、請求項19～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体、請求項29記載の組成物、または請求項30記載の薬学的組成物。
【請求項３２】
疾患の処置に使用するための、請求項1～18のいずれか一項記載の抗体、請求項19～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体、請求項29記載の組成物、または請求項30記載の薬学的組成物。
【請求項３３】
疾患が、がん、感染性疾患、または自己免疫疾患である、請求項32記載の抗体、二重特異性抗体、組成物、または薬学的組成物。
【請求項３４】
請求項1～18のいずれか一項記載の抗体、請求項19～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体、請求項29記載の組成物、または請求項30記載の薬学的組成物を含み、任意で該抗体または該二重特異性抗体が検出可能な作用物質で標識されている、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患について検査するための組成物。
【請求項３５】
（a）請求項27～28のいずれか一項記載の宿主細胞を培養する工程、および
（b）培養培地から抗体を精製する工程
を含む、請求項1～18のいずれか一項記載の抗体または請求項19～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体を生産するための方法。
【請求項３６】
請求項1～18のいずれか一項記載の抗体または請求項19～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体を含む、診断用組成物。
【請求項３７】
（a）試料を、請求項1～18のいずれか一項記載の抗体または請求項19～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体と、該抗体または二重特異性抗体とCD3との複合体の形成が可能な条件下で接触させる工程、および
（b）複合体が形成されたかどうかを解析する工程
を含む、試料中のCD3抗原の存在またはCD3を発現する細胞の存在を検出するための方法。
【請求項３８】
（i）請求項1～18のいずれか一項記載の抗体または請求項19～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体、および
（ii）キットの使用説明書
を含む、試料中のCD3抗原の存在またはCD3を発現する細胞の存在を検出するためのキット。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12Q	*1/04*	*(2006.01)*	C12Q	1/04		
C07K	*16/42*	*(2006.01)*	C07K	16/42		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61P	*31/00*	*(2006.01)*	A61K	39/395	L	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	31/00		
A61P	*37/06*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61P	37/06		
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	G01N	33/53	R	
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	G01N	33/53	D	
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	G01N	33/53	Y	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	1/15		
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C12N	1/19		
			C12N	1/21		
			C12N	5/10		
			C07K	16/46		

(31)優先権主張番号　PA201400009
(32)優先日　平成26年1月9日(2014.1.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
デンマーク(DK)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤　利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林　智彦
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺　秀紀
(74)代理人　100114340
弁理士　大関　雅人
(74)代理人　100114889
弁理士　五十嵐　義弘
(74)代理人　100121072
弁理士　川本　和弥
(72)発明者　ヴァン　デン　ブリンク　エドワード
オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内
(72)発明者　ネイッセン　ヨースト　ジェイ．
オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内
(72)発明者　ラブリン　アラン　フランク
オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内
(72)発明者　ミースターズ　ジョイス
オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内
(72)発明者　シュールマン　ジャニーヌ

オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内
(72)発明者　パレン　ポール
オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内

Ｆターム(参考)
4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS07 QS33 QX01
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA05 DA14
4B065 AA92Y AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 AA16 BB36 BB41 BB43 CC22 CC23 DD62 EE01
4H045 AA11 BA41 CA40 DA76 EA28 EA29 EA51 FA74